



EFEITO DO QUITOSANO NA VIABILIDADE DE *Brettanomyces bruxellensis* E NA PRODUÇÃO DE 4-ETILFENOL EM VINHO

Marta Lopes Egídio Reis

Dissertação para obtenção do Grau Mestre em
Engenharia Alimentar – Qualidade e Segurança Alimentar

Orientador: Professor Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira

Júri:

Presidente: Doutora Margarida Gomes Moldão Martins, Professora Auxiliar com agregação do Instituto Superior Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Vogais: Doutor Manuel José Pimenta Malfeito Ferreira, Professor Auxiliar com agregação do Instituto Superior de Agronomia da Universidade Técnica de Lisboa;

Doutora Catarina Paula Guerra Geoffroy Prista, Professora Auxiliar do Instituto Superior de Agronomia da Universidade de Lisboa.

AGRADECIMENTOS

Ao longo deste trabalho foram muitas as pessoas, que de uma forma ou de outra, contribuíram para a sua realização.

Em primeiro lugar queria agradecer ao Professor Doutor Manuel Malfeito Ferreira, por ter aceitado coordenar este projeto e por me ter dado a oportunidade de integrar o grupo de investigação. Agradeço pelo apoio e conhecimento transmitido ao longo destes últimos meses.

Ao Miguel Fernandes um grande agradecimento pela orientação e ajuda em todo o trabalho laboratorial, pelas orientações e conhecimento mas também por estar sempre presente com a sua boa disposição e amizade, pronto a ajudar não só a nível profissional como pessoal. À Sara Santos um especial agradecimento pela orientação, pela ajuda na organização e estruturação de todo o meu trabalho, pelas críticas construtivas e claro pela sua amizade, que embora tenha surgido há pouco tempo, já se tornou muito importante. À Joana Viseu de Alvalade um especial agradecimento pela amizade, boa disposição, pela descontração, pelas brincadeiras constantes que animavam todos os dias.

A todos os membros do Laboratório de Microbiologia do ISA, Carla Silva, Rute Coutinho, Mahesh Chandra, D. Lena, D. Manuela, Raquel Nisa e Sofia Camilo, agradeço a ajuda e disponibilidade para tudo. Aos amigos da Fisiologia, Ricardo e Alexandre, e à nossa Ritinha um obrigado pelos momentos de descontração nos dias de trabalho.

À minha amiga Catarina Simões, um grande obrigado por todo o apoio dado durante esta fase da minha vida. Agradeço ainda pela pessoa que é, sempre disponível para ouvir e para completar os meus dias com um sorriso. À Beatriz Letras Vivas, que apesar de ter estado fora teve sempre pronta a apoiar, a ouvir e a proporcionar grandes momentos de diversão, grandes sorrisos e grandes momentos de cumplicidade, um grande obrigado.

Às minhas amigas de sempre e para sempre, Catarina Ferreira, Mafalda Almeida, Inês Leal, Diana Antunes e Inês Valada obrigado por todo o apoio, alegria, piadas, divertimento que sempre me proporcionaram.

Aos meus amigos que fizeram parte de mais uma etapa da minha vida, Gonçalo Pereira, Carolina Oliveira, Mónica Baeta, Diogo Brito, Cláudia Catarino, Clara Salvador, Sílvia Boaventura, João Silva, Rafaela Santos, Rita Gamboa um agradecimento muito especial.

Agradeço também aos meus Pais, Alfredo e Isabel, por todo o apoio, por aturarem muitas vezes o meu mau humor e as minhas inseguranças e por acreditarem sempre em mim. À minha irmã Margarida, agradeço toda a disponibilidade e paciência para me ajudar com o MATLAB, para me ouvir e pela grande amizade. À minha tia Manuela por todos os momentos e por ser o meu refúgio, um grande obrigado.

RESUMO

As espécies de leveduras de contaminação, *Brettanomyces bruxellensis*, podem originar a formação de bio filmes em vinhos armazenados, sedimentos, produção de gases e ainda produção de sabores e aromas desagradáveis para o consumidor.

O quitosano apresenta-se como um potencial produto de controlo de leveduras de alteração no vinho, que tem efeitos antimicrobianos comprovados. Em condições laboratoriais foi testado o efeito de diferentes concentrações de quitosano no controlo de diferentes estirpes de *B. bruxellensis* em meio sintético e vinho. A viabilidade celular foi seguida em placa com meio GYP, por hemocitómetro e por análise da concentração de 4-etilfenol.

Em meio sintético foi possível controlar o crescimento com 1 g/L de quitosano. Em vinho, foram necessárias concentrações mais baixas, pois o ambiente é mais stressante. Com baixas concentrações celulares e em células não adaptadas ao vinho, foi possível controlar o desenvolvimento das estirpes testadas com 0,1 g/L e 0,05 g/L. No entanto, com quitosano adicionado após a fase exponencial só foi possível controlar o crescimento celular com 0,5 g/L. A produção de 4-etilfenol só atingiu valores significativos, superiores a 800µg/L, no ensaio onde as células estavam bem adaptadas ao vinho.

Os resultados deste ensaio mostraram que o efeito do quitosano é dependente da estirpe, concentração celular, fase de crescimento celular e que a produção de 4-etilfenol só foi significativa no ensaio em vinho com células bem adaptadas. A utilização do quitosano não teve efeito no estado VBNC das células.

Palavras-chave: *B. bruxellensis*; quitosano; 4-etilfenol; crescimento celular; Vinho; contaminação

ABSTRACT

The spoilage yeast, *Brettanomyces bruxellensis*, can cause the formation of film in storage wine, sediments, gas production and the production of unpleasant tastes and flavors to the consumer.

Chitosan is presented as a potential product to control the yeast that alter the wine. Under laboratory conditions the effect of chitosan at different concentrations was tested in the growth of various *B. bruxellensis* strains in synthetic medium and wine. Viability was followed in plate with GYP medium, by hemocytometer counting with vital staining. Production of 4-ethylphenol was also analyzed.

In synthetic medium it was possible to control the growth with 1 g/L of chitosan. In wine the necessary concentrations were lower, because it is a more stressful environment. With lower concentrations and with poorly adapted cells it was possible to control, the growth of the strains tested with 0,1 g/L and 0,05 g/L. However, when chitosan is added after the exponential phase, it is only possible to control the growth with 0,5 g/L. The production of 4-ethylphenol only reached significant values, over 800µg/L, on the wine trial with well adapted cells.

The results in this trial show that the effect of chitosan is dependent of the strain, cellular concentration, growth stage of the cells and that the production of 4-ethylphenol was significant only in wine with well adapted cells. The usage of chitosan has no effect on the VBNC stage of the cells.

Keywords: *Brettanomyces bruxellensis*; chitosan; 4-ethylphenol; cellular growth; wine; contamination

EXTEND ABSTRACT

Contamination yeasts *Brettanomyces bruxellensis* occurs mainly after the fermentation and during aging of alcoholic beverages, such as wine and beer. They represent a problem for the wine industry because they can be at the origin of contaminations along the process of red wine production or during storage in wood barrels.

These contaminations can be alterations in flavor and smell of wine, caused by the production of volatile phenols. These alterations are associated to the production of unpleasant smells such as “horse sweat” or “mousy” taint. These alterations lead to a decreased originating large economic loss in the wine industry.

The control of these yeasts is of great importance because *B. bruxellensis* has the ability to maintain viability for long periods of time and to develop under unfavorable conditions. In this particular state cell are designated as Viable But Non Culturable or VBNC stage.

The growth and the production of volatile phenols by *B. bruxellensis* in wine can be influenced by various factors such as ethanol concentration, sugar concentration, temperature, pH, presence of oxygen and use of preservatives/antimicrobial agents, like sulfur dioxide (SO₂).

SO₂ is the most used conservative in wine. It is a chemical product and its used in wine has gradually become more restricted. There is a growing concern with health and a tendency to use natural conservatives, which brings interest in the study of effective alternative conservatives like chitosan.

Chitosan is a natural polymer obtained by a deacetylation of chitin, and has many uses in the food industry, biomedicine, agriculture and environment. Chitin is present in crustaceans, like crab and lobster, and in cell walls of fungi. The deacetylation of chitin promotes alteration in physical and chemical characteristics, making chitosan a compound with a better solubility and a better antimicrobial and antifungal activity. Furthermore, chitosan is biodegradable, nontoxic and odorless and tasteless product.

The chitosan used in wine is usually from fungal origin. The maximum concentration that can be applied is 0,1g/L. Its capacity for reducing the presence of undesirable microorganism like *B. bruxellensis* has attracted much attention as an alternative to SO₂. However, there aren't many studies showing its effect in yeasts of this genus.

Taking into account the characteristics of chitosan, its effect on cellular viability of *B. bruxellensis* was tested under laboratory conditions, to determine what concentration would be sufficient to control the growth. Different concentrations of this conservative were tested in

synthetic medium and wine, in different cellular concentrations and in different phases of cellular growth.

In synthetic medium it was verified that higher concentrations are needed to inhibit the microbial activity of this yeast (over 1 g/L). In wine, when the cells are poorly adapted it is possible to control the cellular viability, as well as the production of 4-ethylphenol, with lower concentrations of chitosan, 0,1 g/L and 0,05 g/L. However, when cells are well adapted to the wine and the cellular concentration is higher, it is only possible to control its viability with a concentration over 0,5 g/L.

With this study it was possible to conclude that the effect of chitosan in the viability of *B. bruxellensis* and in the production of 4-ethylphenol can depend of many variables such as cellular concentration, stage of cellular growth and also strain specific. It was also verified that chitosan has no influence in the VBNC stage of cells, and that there are only differences in strains, proving once again the variability between strains.

It would be interesting to continue this work testing more strains of *B. bruxellensis*, other wine microorganisms, as well as to simulate more realistic conditions to determine chitosan efficiency in wine.

ÍNDICE GERAL

RESUMO	v
ABSTRACT	vi
EXTEND ABSTRACT	vii
LISTA DE ABREVIATURAS	xv
ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS	1
1.Revisão da Literatura	2
1.1.Qualidade e Segurança Alimentar.....	3
1.2.Vinho e microbiologia.....	4
1.2.1.Leveduras contaminantes.....	5
1.2.2.Leveduras do género <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	7
1.2.3. <i>Brettanomyces bruxellensis</i>	9
1.3.Produção de fenóis voláteis	10
1.3.1.Fatores que afetam o crescimento e influenciam a produção de 4-etilfenol por <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	11
1.3.1.1.Etanol	12
1.3.1.2.pH.....	12
1.3.1.2.Oxigénio.....	12
1.3.1.3.Temperatura	12
1.3.1.4.Concentração de açúcares	13
1.4.Estratégias de deteção e identificação	13
1.5.Estratégias de controlo de leveduras do género <i>Dekkera/Brettanomyces</i>	14
1.5.1.Boas práticas de higiene	15
1.5.2.Filtração	15
1.5.3.Conservantes	16
1.5.3.1.Dióxido de enxofre (SO ₂)	16
1.5.3.2.Dimetildicarbonato (DMDC)	17
1.5.3.3.Ácido Sórbico.....	18

1.5.3.4. Quitosano	18
2. Materiais e Métodos	23
2.1. Estirpes utilizadas	24
2.2. Solução de Quitosano	24
2.3. Vinho utilizado	26
2.4. Estudo do efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> em meio sintético por incorporação	26
2.4.1. Preparação do inóculo	26
2.4.2. Meio de cultura e condições de crescimento	27
2.5. Efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> em meio GYP líquido	27
2.5.1. Preparação do inóculo	27
2.5.2. Meio de cultura e condições de crescimento	27
2.6. Efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> e na produção de 4-etilfenol em vinho em células não adaptadas	29
2.6.1. Preparação do inóculo	29
2.6.2. Condições de crescimento	29
2.7. Efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> e na produção de 4-etilfenol em vinho em células adaptadas	30
2.9. Produção de fenóis voláteis	30
2.9.1. Amostragem	30
2.9.2. Extração de 4-vinilfenol e 4-etilfenol	30
2.9.3. Análise cromatográfica	31
2.9.4. Quantificação do 4-etilfenol	32
3. Resultados e Discussão	33
3.1. Estudo do efeito do quitosano no crescimento de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> em meio sintético	34
3.2. Efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> e na produção de 4-etilfenol em vinho em células não adaptadas	36
3.3. Efeito do quitosano na viabilidade de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> e na produção de 4-etilfenol em vinho em células adaptadas	39

4.Conclusões	45
5.Referências Bibliográficas	48

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1 – Limite de aplicação de conservantes no vinho	22
Tabela 2 - Origem das estirpes de leveduras da espécie <i>Brettanomyces bruxellensis</i> utilizadas	24
Tabela 3 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em meio GYP líquido	25
Tabela 4 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em vinho em células não adaptadas	25
Tabela 5 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em vinho em células adaptadas	26

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Leveduras de contaminação ou alteração do vinho (adaptado de Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).	6
Figura 2 - Observação ao microscópio de <i>Brettanomyces</i> sp. (Suárez <i>et al.</i> , 2007).	8
Figura 3 - Mecanismo de produção de 4-etilfenol e 4-etilguaicol (adaptado de Suárez <i>et al.</i> , 2007).	11
Figura 4 – Fórmula estrutural do quitosano ($C_6H_{11}NO_4$) (OIV, 2009)	19
Figura 5 – Balão de <i>erlenmeyer</i> com rolha de borracha e seringa.	28
Figura 6 - Separação de fase aquosa e fase orgânica utilizando uma ampola de decantação.	31
Figura 7 - Picos detetados no intervalo entre 13,65 e 14,15 GC (1º 4-EF (13,66 minutos) e 2º padrão interno (14,14 minutos)).	32
Figura 8 – Ensaio em meio sólido com gotas de quitosano de diferentes concentrações.	34
Figura 9 – Comportamento das estirpes de <i>Brettanomyces bruxellensis</i> ISA 1791 (a) e ISA 2202 (b) em meio GYP com 0,1 g/L de quitosano. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	35
Figura 10 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	37
Figura 11 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	37
Figura 12 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	39
Figura 13 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	40
Figura 14 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	40
Figura 15 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	41
Figura 16 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 1 g/L de quitosano em vinho com células bem adaptadas. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	41
Figura 17 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,5 g/L de quitosano em células bem adaptadas do vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	42
Figura 18 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.	42

Figura 19 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,5 g/L de quitosano em células bem adaptadas do vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.43

LISTA DE ABREVIATURAS

4-EF	4-Etilfenol
D.O.	Densidade Ótica
DMDC	Dimetildicarbonato
CG/GC	Cromatografia Gasosa/Gas Chromatography
GYP	Glucose Yeast Peptone
HACCP	Hazard Analysis and Critical Control Points
OIV	Organização Internacional da Vinha e do Vinho
UFC	Unidades Formadoras de Colónias
VBNC	Viable But Non Culturable / Viáveis Mas Não Cultiváveis

ENQUADRAMENTO E OBJETIVOS

As leveduras de contaminação representam um sério problema para a indústria do vinho pois estão na origem da desvalorização do produto final, podendo originar elevadas perdas económicas (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Fugelsang e Edwards, 2007; Barata *et al.*, 2013). A contaminação pode estar associada a alguns efeitos negativos como a produção de aromas e *flavors* desagradáveis, a formação de bio filmes, a deposição de sedimento e a origem de turvação (Carrascosa *et al.*, 2011). Das leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*, *B. bruxellensis*, é provavelmente a espécie que melhor representa a contaminação do vinho por leveduras (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006).

O controlo de *B. bruxellensis* envolve a utilização de conservantes, filtração e boas práticas de higiene. Os conservantes permitem a estabilização microbiana e com as suas propriedades antimicrobianas conseguem evitar ou minimizar contaminações que possam surgir ao longo do processo de produção. O dióxido de enxofre (SO₂) é o inibidor mais utilizado para o controlo destas leveduras (Suárez *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2008a; Zuehlke *et al.*, 2013). No entanto, com o aumento das preocupações com a saúde pública, a preferência do consumidor por alimentos naturais e o aumento da legislação que restringe o nível de SO₂ que pode ser adicionado, surge a tendência para estudar produtos alternativos, como o quitosano (Enrique *et al.*, 2007).

O quitosano é derivado da quitina, que é um polímero natural que pode ser encontrado na natureza, como por exemplo em crustáceos, como o camarão ou o caranguejo, insetos e fungos. Para além da possibilidade de utilização no vinho, o quitosano é biodegradável, bio funcional e possui propriedades antimicrobianas e antifúngicas (Pillai *et al.*, 2009; Aider, 2010).

Tendo em conta as características do quitosano, e para melhor entender o comportamento de *Brettanomyces bruxellensis* na presença deste antimicrobiano estabeleceram-se os seguintes objetivos:

- Determinar a concentração inibitória do quitosano para esta levedura, em meio sintético e em vinho;
- Avaliar a capacidade antimicrobiana do quitosano em diferentes fases do crescimento da levedura e em diferentes concentrações celulares.
- Avaliar o efeito do quitosano na produção de 4-etilfenol pela levedura.

1.REVISÃO DA LITERATURA

1.1.Qualidade e Segurança Alimentar

O conceito de qualidade e segurança alimentar ganha cada vez mais importância, sendo tema de discussão não só para o consumidor mas também para as entidades reguladoras responsáveis, para as indústrias alimentares e para os investigadores. Estas discussões surgem das preocupações existentes devido ao aumento da variedade de alimentos disponíveis no mercado, à prevalência de problemas de saúde pública, ao tipo de processamento aplicado e ainda ao aumento do interesse e do nível de satisfação do consumidor (Grunert, 2005; Burlingame e Pineiro, 2007).

Integrar os conceitos de qualidade e segurança alimentar é algo subjetivo, que depende de um grande número de indivíduos. No entanto, é importante realçar que um produto com qualidade tem que ser seguro, mas que um produto seguro não tem necessariamente de ter qualidade, o que nos demonstra a importância do desafio de integração destes dois conceitos (FAO/WHO, 2003). A existência de um sistema de prevenção, redução e minimização dos riscos associados aos produtos alimentares é importante para minimizar a ocorrência de perigos que possam colocar a segurança do produto em causa, bem como a sua qualidade. O sistema utilizado para este fim é conhecido como Análise de Perigos e Pontos de Controlo Críticos ou *Hazard Analysis and Critical Control Points* (HACCP) (FAO/WHO, 2003; Burlingame e Pineiro, 2007).

Ao longo do processamento de alimentos, existem vários fatores que devem ser controlados como as contaminações microbianas, os resíduos de pesticidas, os aditivos alimentares, as contaminações químicas, a adulteração de alimentos, a presença de alérgenos, entre outros, de forma a evitar a ocorrência de perigos, tanto para a qualidade como para a segurança alimentar (FAO/WHO, 2003).

Uma das preocupações da indústria alimentar é garantir a estabilidade microbiana dos alimentos ao longo de todo o processo de produção, armazenamento e distribuição, bem como aumentar o período de vida útil e a qualidade do produto no consumidor.

1.2.Vinho e microbiologia

O vinho é um produto alimentar, que resulta da fermentação alcoólica das uvas e que está sujeito à ação de inúmeros microrganismos ao longo do seu processo de produção e armazenamento. A sua composição e qualidade dependem de inúmeras variáveis, e algumas dessas dependem da microbiota presente no vinho (Cocolin e Ercolini, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011). Vários microrganismos estão envolvidos no processo de produção do vinho, como leveduras, fungos e bactérias que contribuem de diferentes formas para a produção e para qualidade e complexidade do vinho (Fleet, 2003; Renouf *et al.*, 2007; Malfeito-Ferreira, 2010). A importância que este produto tem, não só no mundo mas também em Portugal, torna a microbiologia enológica uma área determinante para a produção de vinhos com características agradáveis aos olhos do consumidor e isentos de defeitos (Fleet, 2003; Fugelsang e Edwards, 2007).

Várias espécies de microrganismos pertencentes ao género *Saccharomyces* estão envolvidas na fermentação alcoólica, no entanto a espécie predominante é *Saccharomyces cerevisiae*. A fermentação alcoólica consiste na bio conversão de fontes de carbono, maioritariamente glucose e frutose, em etanol (Cocolin e Ercolini, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011).

Após a fermentação alcoólica, pode ocorrer uma bio conversão do ácido málico em ácido láctico, que é geralmente denominada por fermentação malolática, e que é da responsabilidade de bactérias lácticas. Esta é considerada como uma segunda fermentação e ocorre durante o armazenamento, normalmente algumas semanas após a fermentação alcoólica. Este processo é lento e pode decorrer durante semanas ou até mesmo meses, no entanto pode ser responsável pela redução da acidez, pela estabilidade biológica do vinho e pela melhoria das características organoléticas do produto, que traduzem processos determinantes na qualidade do produto final (Fugelsang e Edwards, 2007; Genisheva *et al.*, 2013).

O vinho pode sofrer contaminações microbianas durante a produção, processamento, engarrafamento, transporte e distribuição, e por isso é necessário aplicar medidas de prevenção, ao nível sanitário, de forma permanente. Na vinificação, os perigos microbiológicos são os que têm maior relevância, e estão relacionados com microrganismos deteriorantes, provenientes do ambiente, dos equipamentos e dos trabalhadores. No entanto, o risco de contaminações patogénicas no vinho é reduzido ou nulo, devido às próprias características do produto, como é o caso do teor alcoólico, do baixo pH e da presença de sulfuroso (Fugelsang e Edwards, 2007).

Segundo o Regulamento (CE) nº852/2004, o sistema HACCP deve ser aplicado adequadamente em qualquer indústria alimentar como é o caso da indústria do vinho. A aplicação deste sistema numa adega permite conhecer ao pormenor o processo produtivo, garantindo uma maior eficácia, permitindo controlar a qualidade e segurança do produto. Este sistema pode também ser aplicado sobre outro ponto de vista, de forma a melhorar o processo de produção, criando pontos de controlo de qualidade, com objetivo de aumentar a qualidade do produto. Alguns pontos críticos de qualidade, no que diz respeito à microbiologia do vinho são a fase de colheita e transporte das uvas para a adega, entre fermentações, a fase de armazenamento/envelhecimento em barrica e o engarrafamento (Fugelsang e Edwards, 2007; Carrascosa *et al.*, 2011).

Um dos grandes desafios da microbiologia do vinho é assegurar que a contaminação por parte da microbiota vínica de alteração não ocorra, garantindo assim a qualidade do produto e a sua estabilidade microbiana. O controlo microbiano, bem como a qualidade das uvas e as boas práticas de higiene e fabrico durante todo o processo de produção do vinho, são aspetos muito importantes, não só para minimizar a contaminação microbiana, mas também para garantir a qualidade durante o processo de produção do vinho, e do produto final que chega ao consumidor (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

1.2.1. Leveduras contaminantes

A contaminação microbiana do vinho pode ocorrer em várias fases do processo, desde a uva até à garrafa, e inclui vários microrganismos como bactérias lácticas, bactérias acéticas e várias espécies de leveduras, que são, geralmente, os contaminantes mais preocupantes. Na Figura 1 estão representados os géneros de leveduras envolvidos na contaminação do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Fleet, 2008; Cocolin e Ercolini, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011).

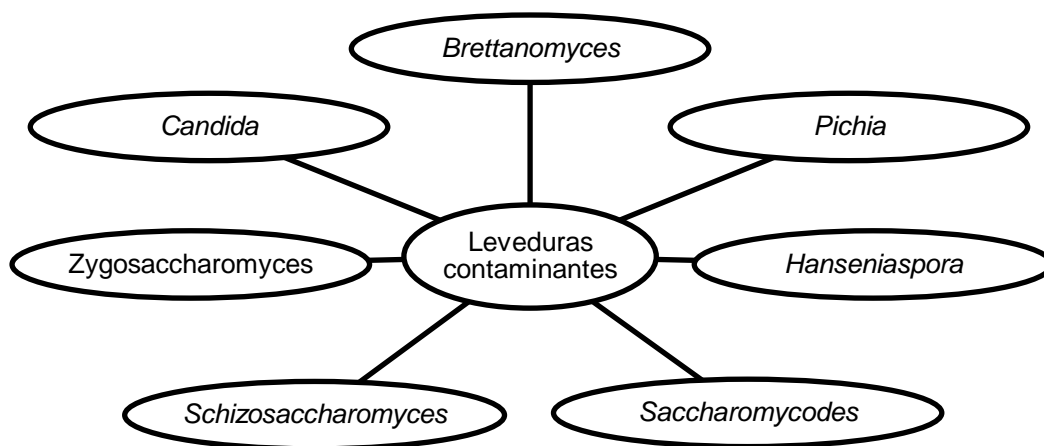


Figura 1 - Leveduras de contaminação ou alteração do vinho (adaptado de Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003).

As leveduras constituem o grupo de microrganismos com maior importância para a produção de vinho, pois sem *S. cerevisiae*, a produção de vinho com qualidade não seria possível. Para além de *S. cerevisiae*, existem vários géneros de leveduras que apresentam um papel importante durante o processo de vinificação, tendo grande influência na qualidade do produto, não só de forma negativa mas também de forma positiva (Fleet, 2003; Fugelsang e Edwards, 2007; Renouf *et al.*, 2007).

O conceito de levedura de alteração está relacionado com a sua capacidade de contaminar um alimento durante o processamento, que já foi processado e embalado de acordo com as boas práticas de higiene e fabrico. No caso de bebidas que resultam da fermentação alcoólica, o conceito de levedura de alteração é mais complexo, pois é considerada contaminante, qualquer levedura que seja capaz de alterar as características sensoriais do alimento (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Fugelsang e Edwards, 2007; Cocolin e Ercolini, 2008).

Na indústria do vinho, a fermentação resulta da ação de várias espécies de leveduras e bactérias, o que torna difícil distinguir os efeitos benéficos da atividade contaminante. Assim, e apesar de ocorrerem vários efeitos deteriorantes antes e ao longo da fermentação, a atividade de leveduras de alteração é mais observada na fase de armazenamento e engarrafamento (Fugelsang e Edwards, 2007). Estas leveduras são temidas pelos enólogos, pois os efeitos mais comuns que podem surgir ao longo de todo o processo de produção, são a formação de bio filmes/películas em vinhos armazenados, a origem de sedimentos, a

produção de gases e ainda a produção de sabores e aromas desagradáveis para o consumidor (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Malfeito-Ferreira, 2010).

No caso das leveduras capazes de alterar o vinho, as que têm desencadeado maior interesse de estudo são as do género *Dekkera/Brettanomyces* (Loureiro e Malfeito-Ferreira 2003). Este interesse surge à volta da sua capacidade de produção de compostos fenólicos, que é essencial para determinar as características organoléticas que caracterizam o vinho e que pode originar perdas económicas para a adega (Fugelsang e Edwards, 2007; Barata *et al.*, 2008a; Carrascosa *et al.*, 2011; Zuehlke *et al.*, 2013).

1.2.2. Leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*

Brettanomyces é a forma não esporulada do género *Dekkera*, sendo frequentemente referida como *Brett*. Em 1904, N Hjelte Claussen da *New Carlsberg Brewery* descreveu a levedura como sendo pertencente ao género *Brettanomyces*. No entanto, só em 1920 o género foi reconhecido, tendo-se isolado esta levedura em cerveja na Bélgica. A revisão da nomenclatura e um primeiro estudo da taxonomia do género *Brettanomyces*, em 1940, levou à identificação de quatro espécies: *B. bruxellensis*, *B. anomalus*, *B. lambicus* e *B. clausenii*. Em 1960, a descoberta da produção de ascósporos, observada por Van der Walt e Van der Kerben, levou à introdução do género teleomorfo *Dekkera*. Estas leveduras pertencem à família *Saccharomycetaceae* (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Fugelsang e Edwards, 2007; Wedral *et al.*, 2010).

D. anomala e *D. bruxellensis* são duas espécies pertencentes ao género *Dekkera*. Os seus anamorfos, fase de reprodução assexuada, são *Brettanomyces anomalus* e *B. bruxellensis*, respetivamente, sendo estas as espécies deste género mais comuns em vinho. Outras espécies são *B. naardenensis*, *B. custerianus* e *B. nanus*. *B. bruxellensis*, sem impacto na qualidade do vinho.

Estas leveduras são maioritariamente associadas a produtos fermentados e podem ser encontradas em diferentes ambientes, particularmente após o processo de fermentação e durante o envelhecimento de bebidas alcoólicas. Podem ser encontradas em alimentos como o vinho, a cerveja, a sidra, o chá e a tequila. Existem algumas referências da sua presença em queijos e em leites fermentados.

A contaminação por leveduras deste género é um problema que surge principalmente entre fermentações e na etapa de armazenamento/envelhecimento do vinho tinto em barricas de

madeira, levando a alterações sérias na qualidade do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Renouf *et al.*, 2007; Fugelsang e Edwards, 2007, Wedralet *et al.*, 2010; Zuehlke *et al.*, 2013).

As leveduras do género *Dekkera*, ou o seu anamorfo *Brettanomyces*, distinguem-se pela forma de reprodução, sexuada ou assexuada, respetivamente. Têm uma forma oval ou elipsoidal e no caso de *Brettanomyces*, esta reproduz-se por gemulação (Figura 2). A morfologia das células pode alterar-se para uma forma mais ramificada após alguns dias de incubação (Wedral *et al.*, 2010).



Figura 2 - Observação ao microscópio de *Brettanomyces* sp. (Suárez *et al.*, 2007).

A morfologia da célula tem um papel importante na identificação presuntiva deste género de leveduras e pode variar de acordo com vários fatores, como a idade, o meio de cultura e o *stress* ambiental que envolve a célula. *Brettanomyces* apresenta uma forma diferente quando cresce em meio sólido ou quando é isolada em barricas de madeira durante o envelhecimento. Em meio sólido, as colónias apresentam uma cor que pode variar entre o branco e o bege, tendo uma forma arredondada, elíptica, alongada ou ramificada. O crescimento desta levedura é lento e requer vários dias para o aparecimento de colónias no meio sólido (Fugelsang and Edwards, 2007). A fisiologia destas leveduras tem sido estudada ao longo das últimas décadas em diferentes partes do mundo, de forma a entender o seu efeito no vinho, e a produção de compostos aromáticos (Suárez *et al.*, 2007).

Brettanomyces possui a capacidade de se manter viável no ecossistema vínico durante longos períodos de tempo, desenvolvendo-se apenas quando as condições ambientais envolventes são mais favoráveis (Malfeito-Ferreira, 2010; Serpaggi *et al.*, 2012). Ao estado em que as células se mantêm metabolicamente ativas, embora sem capacidade de divisão

dá-se o nome de viável mas não cultivável (VBNC – Viable But Non Culturable). O estado VBNC é induzido por condições adversas como a falta de nutrientes, temperaturas baixas, *stress*, pH, tratamentos térmicos, ou a adição de produtos químicos. Quando as células entram neste estado, não são capazes de produzir colónias em meio sólido, mas são capazes de manter atividade metabólica, podendo mais tarde desenvolver a capacidade de produção de aromas, e consequentemente originar perdas de qualidade do produto (Cocolin e Ercolini, 2008; Serpaggi *et al.*, 2012).

Serpaggi *et al.*, (2012) demonstraram que, quando não é adicionado SO₂, as células mantêm-se viáveis e cultiváveis. Os autores demonstraram a capacidade de *Brettanomyces* entrar em estado VBNC após dois dias da adição de meta bissulfito de sódio.

1.2.3. *Brettanomyces bruxellensis*

B. bruxellensis é hoje considerada a espécie com maior representatividade em ambientes enológicos, sendo a maior causa de contaminação do vinho, especialmente em vinhos tintos que passam por um período de envelhecimento em barricas de madeira e também em vinhos engarrafados. Esta pode ser isolada em diferentes alimentos fermentados, como o vinho, e pode ser encontrada na superfície das uvas, nas barricas utilizadas para o seu armazenamento e no vinho engarrafado (Ribéreau-Gayon *et al.*, 2006; Malfeito-Ferreira, 2010).

A sua identificação como contaminante no vinho está associada à capacidade de turvação do vinho, à produção de aromas desagradáveis e à elevada produção de ácido acético. Estas alterações sensoriais estão associadas a aromas desagradáveis como cravinho, especiaria, suor de cavalo, fumo, medicinal, couro, rato, entre outros (Chatonnet *et al.*, 1992, 1995; Du Toit and Pretorius, 2000; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Wedral *et al.*, 2010).

Um dos grandes problemas e desafios para a investigação no vinho, é o defeito designado como suor de cavalo, que surge durante o armazenamento em barrica, envelhecimento do vinho e ainda no vinho engarrafado. No entanto, este tipo de alteração no vinho, em concentrações celulares mais reduzidas, pode não ser considerado um defeito, contribuindo para o desenvolvimento da complexidade das características do vinho (Coterno *et al.*, 2013). Segundo vários autores, as únicas leveduras do género *Dekkera* capazes de produzir etilfenóis, associados ao aroma do suor de cavalo são *D. bruxellensis* e *D. anomala*. Os etilfenóis mais encontrados no vinho são o 4-etilfenol e o 4-etilguaicol. A sua presença

funciona como um indicador da atividade desta levedura (Dias *et al.*, 2003; Cocolin e Ercolini, 2008; Coterno *et al.*, 2013).

Como já foi referido, em baixas concentrações, a presença destes indicadores contribui para as características do vinho, no entanto, quando presente em elevadas concentrações, ocorre a formação de um aroma intenso que contribui de forma exagerada para as suas características, tornando o vinho desagradável e podendo proporcionar experiências negativas para o consumidor (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Wedral *et al.*, 2010). No entanto, existem consumidores que preferem vinhos com presença de fenóis voláteis (Malfeito-Ferreira, 2010).

1.3. Produção de fenóis voláteis

Um dos efeitos mais relevantes produzidos por *B. bruxellensis* são as alterações de aroma e *flavor* provocadas pela presença de fenóis voláteis. Estas alterações ocorrem, geralmente em vinhos tintos pois estes passam por um estágio em barricas de madeira, uma das origens de contaminação desta levedura. O aumento da acidez volátil e a produção de tetrahidropiridinas no vinho podem também ocorrer pela presença de *Brettanomyces* (Dias *et al.*, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Suárez *et al.*, 2007; Cocolin e Ercolini, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011).

Os etilfenóis resultam da descarboxilação enzimática e posterior redução dos ácidos hidroxicinâmicos, como o ácido p-cumárico e o ácido ferúlico (Figura 3). Existem vários microrganismos, como bactérias, fungos e leveduras, presentes no vinho que são capazes de sintetizar 4-etilfenol e 4-etilguaicol, ou seja, que são capazes de realizar a fase de descarboxilação, a partir de ácido ferúlico e ácido p-cumárico, mas a maior parte não é capaz de realizar a fase de redução dos etilfenóis a partir do vinilfenol (4-vinilfenol e 4-vinilguaicol) (Dias *et al.*, 2003; Suárez *et al.*, 2007; Carrascosa *et al.*, 2011; Coterno *et al.*, 2013; Zuehlke *et al.*, 2013). *Brettanomyces* tem a capacidade de usar o vinilfenol sintetizado por outros microrganismos, como precursor dos etilfenóis, aquando a ausência de ácido p-cumárico (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Fugelsang e Edwards, 2007; Suárez *et al.*, 2007; Coterno *et al.*, 2013).

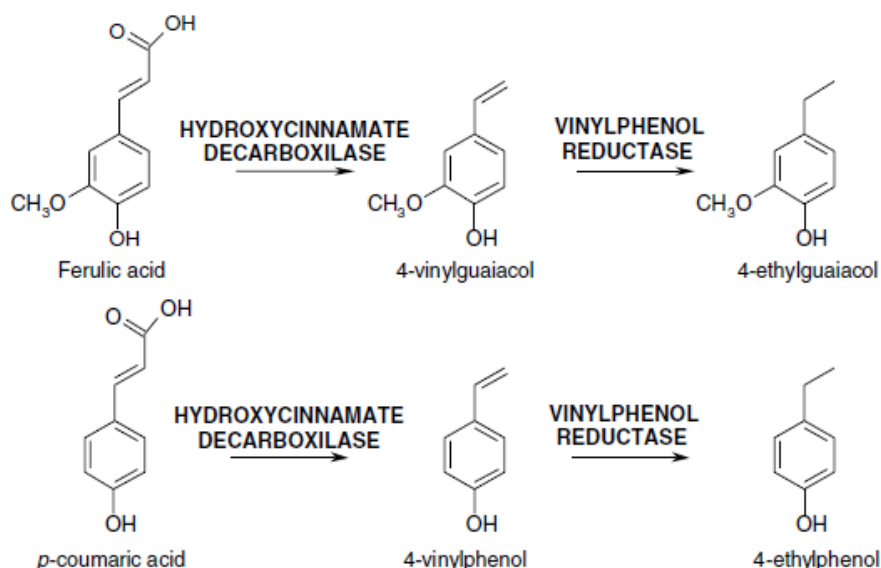


Figura 3 - Mecanismo de produção de 4-etilfenol e 4-etilguaicol (adaptado de Suárez *et al.*, 2007).

O *flavor* e aroma dependem do vinho e das preferências do enólogo e do consumidor (Fleet, 2003). Loureiro e Malfeito-Ferreira (2003) referem que alguns consumidores consideram o vinho alterado quando a concentração de 4-etilfenol é superior a 600µg/L. Os autores sugerem ainda que com concentrações superiores a 400µg/L o vinho já é considerado danificado e que quando a concentração é inferior a 400µg/L contribui para a complexidade das características sensoriais do vinho (Du Toit e Pretorius, 2000).

1.3.1.Fatores que afetam o crescimento e influenciam a produção de 4-etilfenol por *Dekkera/Brettanomyces*

A concentração de 4-etilfenol está relacionada com o nível de contaminação e com a presença de precursores. Existem vários fatores que afetam o crescimento e consequentemente a produção de fenóis voláteis, como é o caso do etanol, da concentração de açúcar, da temperatura, do pH, do oxigênio (O₂), e de conservantes/antimicrobianos aplicados no vinho (Dias *et al.*, 2003; Fleet, 2003; Suárez *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2008b; Fleet, 2008; Carrascosa *et al.*, 2011).

1.3.1.1.Etanol

B. bruxellensis pode ser encontrada em várias fases do processo de vinificação, devido à sua capacidade de tolerância ao teor de etanol. Esta é capaz de tolerar valores até 14-14,5% de etanol em vinhos tintos (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Coterio *et al.*, 2013).

No entanto, segundo Dias *et al.* (2003), quando o teor de etanol é superior a 10%, a taxa de crescimento e o nível de produção de 4-etilfenol é mais baixa. Os autores referem, ainda, que a 12% ocorre uma redução significativa da produção de 4-etilfenol e que a valores iguais ou superiores a 13%, não ocorre produção de 4-etilfenol, ou seja, a quantidade de etanol tem uma grande influência na inibição desta levedura.

1.3.1.2.pH

O pH do vinho é mais uma variável que permite controlar o crescimento de *Brettanomyces*. Deve ser mantido baixo, ou seja, igual ou inferior a 3,5, pois contribui para a estabilização das condições físico-químicas do vinho, promovendo a redução da viabilidade de *Brettanomyces*. A combinação de valores de pH altos com o sulfuroso (SO_2), em baixas concentrações, promove o crescimento de microrganismos responsáveis por alterar o vinho (Suárez *et al.*, 2007; Zuehlke *et al.*, 2013).

1.3.1.2.Oxigénio

O género *Brettanomyces* é conhecido como sensível à disponibilidade de O_2 sendo o controlo da sua concentração mais uma forma de monitorizar o crescimento desta levedura. Em 1940, Custers mostrou que o oxigénio, para além de estimular a fermentação alcoólica, tem um papel importante do desenvolvimento de leveduras deste género, pois promove o seu crescimento (Uscanga *et al.*, 2003). A repressão temporária da fermentação alcoólica em condições de anaerobiose tem o nome de efeito de Custers (Suárez *et al.*, 2007; Zuehlke *et al.*, 2013).

Em concentrações reduzidas de O_2 , a quantidade de compostos fenólicos produzidos diminui cerca de 80%. O oxigénio para além de estimular o crescimento de *Brettanomyces* estimula a produção de ácido acético (Malfeito-Ferreira *et al.*, 2001; Suárez *et al.*, 2007).

1.3.1.3.Temperatura

B. bruxellensis consegue crescer a temperaturas entre 10°C e 37°C, no entanto a sua temperatura ótima de crescimento ronda valores entre os 25°C e os 32°C (Zuehlke *et al.*,

2013). Segundo Barata *et al.*, (2008b), à temperatura de 36°C poderá ocorrer a inativação de *B. bruxellensis* em vinhos contaminados. A temperaturas inferiores a 36°C, verificam-se efeitos pouco significativos na viabilidade das células e na produção de 4-etilfenol (Barata *et al.*, 2008b).

A temperatura de armazenamento do vinho é um fator que deve ser controlado e que tem uma grande influência no desenvolvimento desta levedura, mas não é um agente com ação letal (Malfeito-Ferreira, 2010). Esta temperatura deve ser mantida entre 10 e 15°C, de forma a limitar a atividade microbiana (Suárez *et al.*, 2007).

1.3.1.4. Concentração de açúcares

Para que ocorra crescimento microbiano é necessário que exista uma fonte de carbono. A fonte mais evidente são os açúcares do mosto, mas podem também ser consumidos outros substratos como o etanol e o acetato de etilo provenientes da fermentação.

Esta levedura consome preferencialmente glucose, mas consegue utilizar como fonte de carbono também a frutose ou o etanol. Quanto maior a concentração de açúcares maior é o consumo e crescimento de *Brettanomyces*, consequentemente maior é a produção de 4-etilfenol. Verifica-se que na presença destes açúcares, a produção de 4-etilfenol ocorre a partir de 0,2 g/L.

Segundo Barata *et al.*, (2008b), o crescimento de *Brettanomyces* na presença de glucose e frutose, como fonte de carbono é bastante semelhante. Neste estudo foram testadas diferentes concentrações de glucose e frutose (0,02 g/L, 0,2 g/L, 1 g/L e 20 g/L) e verificou-se que a partir de 0,2 g/L é detetada a produção de 4-etilfenol. Os autores referem ainda que quanto maior a concentração de açúcares maior é a disponibilidade de consumo e maior é o crescimento de *Brettanomyces*, e consequentemente maior é a produção de 4-etilfenol.

1.4. Estratégias de deteção e identificação

Brettanomyces pode ser isolada em uvas, adegas e é frequentemente encontrada em vinhos tintos engarrafados. Esta levedura é difícil de isolar em comparação com outras leveduras, pois possui uma baixa taxa de crescimento, sendo necessária a utilização de um meio seletivo, cujo período de incubação é mais demorado, e constitui geralmente, uma fonte de *stress*. A deteção pode ser baseada no crescimento em placa, podendo ser necessária uma filtração de modo a concentrar amostras com baixas contagens de

Brettanomyces. (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Benito, *et al.*, 2009; Malfeito-Ferreira, 2010).

A existência de longos períodos de incubação até à deteção pode gerar falsos positivos, pois vários géneros microbianos possuem uma taxa de crescimento mais rápida, mesmo com a utilização de meios seletivos ou semi-seletivos (Benito *et al.*, 2009). Dois dos meios seletivos e diferenciais descritos para leveduras do género *Brettanomyces* são o BSM e o DBDM (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006).

Os resultados presuntivos obtidos através de culturas em meio podem ser confirmados utilizando técnicas de identificação moleculares. O desenvolvimento destas técnicas nos últimos anos justifica a sua aplicação ao nível industrial. Técnicas como *Polymerase chain reaction* (PCR), *Restriction Fragment Length Polymorphism* (PCR-RFLP), *Random amplified polymorphic DNA* (RAPD) são utilizadas na indústria alimentar (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2003; Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Fugelsang e Edwards, 2007).

A aplicação de técnicas moleculares na identificação de leveduras do vinho é uma forma eficaz perante alguns problemas dos métodos clássicos referentes à taxonomia. A nomenclatura de *Brettanomyces* sofreu alterações após utilização deste tipo de técnica na revisão da taxonomia (Cocolin *et al.*, 2004).

Outra forma de deteção indireta e presuntiva é a quantificação de 4-etifenol, que é feita através de cromatografia gasosa (CG). Esta técnica é utilizada para detetar fenóis voláteis em vinho. Este método permite a separação de compostos presentes numa amostra de vinho, sendo que quanto maior a concentração desses compostos maior será a sua expressão. A cromatografia gasosa permite identificar e quantificar estes compostos, permitindo analisar indiretamente a presença de *Brettanomyces*. A junção desta técnica com a análise sensorial forma uma ferramenta eficaz para o controlo da qualidade do vinho (Loureiro e Malfeito-Ferreira, 2006; Fugelsang e Edwards, 2007 Suárez *et al.*, 2007).

1.5.Estratégias de controlo de leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces*

A monitorização/controlo de *Brettanomyces* no vinho e nas superfícies de contacto com o vinho é um ponto crítico de grande importância para os produtores de vinho (Barata *et al.*, 2008a). Para além do controlo dos fatores já referidos anteriormente, que afetam o crescimento e a produção de 4-etilfenol por *Brettanomyces*, é importante a aplicação de boas práticas de higiene, a aplicação de conservantes, como o SO₂, que permitem também

controlar o risco de contaminação microbiana durante o processo de vinificação, e ainda a aplicação de técnicas como a filtração (Cocolin e Ercolini, 2008; Zuehlke *et al.*, 2013).

B. bruxellensis mostra ser resistente a baixos valores de pH, a elevadas concentrações de etanol e de sulfuroso, que geralmente são suficientes para controlar microrganismos indesejáveis no vinho (Barata *et al.*, 2008a; Malfeito-Ferreira, 2010; Carrascosa *et al.*, 2011). Assim, estratégias de controlo e prevenção de contaminações por *B. bruxellensis* são importantes para garantir a qualidade dos vinhos (Barata *et al.*, 2008a).

1.5.1.Boas práticas de higiene

A higienização é um processo muito importante para a prevenção de contaminações, pois permite evitar contaminações devido a equipamentos e superfícies mal higienizadas e evitar contaminações cruzadas dentro do ambiente de adega. Consiste na limpeza e desinfeção e é feita geralmente com água quente e com agentes desinfetantes como soluções de sulfito, vapor ou ozono (Fugelsang e Edwards, 2007; Malfeito-Ferreira, 2010).

A utilização de materiais de fácil higienização, como o inox, permite uma maior eficiência no processo de limpeza. Materiais rugosos como o plástico, a borracha ou a madeira, dificultam a higienização, devido à elevada porosidade. A madeira é um material muito utilizado e de grande importância na indústria do vinho, pois tem uma grande contribuição na qualidade dos vinhos tintos, durante o armazenamento em barrica. Contudo, as barricas de madeira representam uma das maiores dificuldades na prevenção de *Brettanomyces*, devido à dificuldade de higienização. Devido à elevada porosidade da madeira, este é um dos pontos críticos do processo, pois é difícil chegar aos pequenos poros onde se encontram células microbianas (Malfeito-Ferreira, 2010). A utilização repetida dessas barricas de madeira torna a sua utilização mais perigosa e sugere que a higienização e desinfeção das barricas vazias não são suficientes para controlar o aparecimento desta levedura (Chatonnet *et al.*, 1995; Malfeito-Ferreira e Loureiro, 2003; Barata *et al.*, 2013).

1.5.2.Filtração

O vinho engarrafado não sujeito a filtração pode conter vários géneros de leveduras, bactérias acéticas e bactérias lácticas, que podem estar na origem de contaminações no vinho. A filtração é uma técnica que pode ser utilizada em vinhos antes do engarrafamento, ajudando na estabilização do produto e na prevenção da origem de defeitos que alteram a qualidade do produto (Umiker *et al.*, 2012).

Geralmente, a filtração é efetuada com filtros de porosidade de 0,45 μm , para manter estável a microbiota total no vinho (Fugelsang e Edwards, 2007; Umiker *et al.*, 2012). Para a remoção de *Brettanomyces* a utilização de um filtro com uma porosidade de 1 μm é suficiente. Umiker *et al.* (2012) demonstraram que um filtro de 1,2 μm é adequado para a remoção de *Brettanomyces* em vinho. Estes autores referem ainda que com a adição de SO_2 as células desta levedura alteram a sua morfologia (estado VBNC), tornando-se mais pequenas, sendo que para algumas estirpes será necessário a utilização de filtros com uma porosidade menor, de cerca de 0,8 μm .

O processo de filtração pode ser considerado como um processo que estabiliza o vinho mas também existem vários investigadores que acreditam que está na origem da redução da qualidade do vinho. Arriagada-Carrazana *et al.*, (2005) mostraram que uma filtração, utilizando um filtro com 0,65 μm , esteve na origem de reduções na cor e aromas do produto.

1.5.3.Conservantes

O controlo dos fatores que afetam a produção de 4-etilfenol pode não ser suficiente e por isso surge a necessidade de utilização de produtos químicos com propriedades conservantes e antimicrobianas (García-Ruiz *et al.*, 2008). Os conservantes químicos utilizados durante o processo de produção do vinho, têm como objetivo a estabilização microbiana de forma a evitar contaminações e manter a qualidade do produto. O conservante químico mais utilizado é SO_2 , que é conhecido vulgarmente como sulfuroso (Suárez *et al.*, 2007; Barata *et al.*, 2008a; Cocolin e Ercolini, 2008; Zuehlke *et al.*, 2013).

A existência de algumas preocupações relacionadas com a saúde, nomeadamente alergias, tem vindo a originar a redução da utilização de SO_2 e a adotar formas alternativas como o dimetildicarbonato (DMDC), o ácido sórbico ou antimicrobianos naturais como o quitosano (Barata *et al.*, 2008a; García-Ruiz *et al.*, 2008; Malfeito-Ferreira, 2010).

1.5.3.1.Dióxido de enxofre (SO_2)

O SO_2 , ou dióxido de enxofre, é utilizado na indústria alimentar e na indústria do vinho, sendo conhecidas propriedades antioxidantes e antimicrobianas (Fugelsang e Edwards, 2007; Cocolin e Ercolini, 2008). É o inibidor mais utilizado no caso de leveduras do género *Brettanomyces* (Suárez *et al.* 2007; Barata *et al.*, 2008a; Cocolin e Ercolini, 2008; Zuehlke *et al.*, 2013).

O SO_2 pode ser encontrado no vinho em duas formas, livre e combinado e a sua forma ativa é o SO_2 molecular. O SO_2 combinado, combina-se com compostos carbonilos como

açúcares e derivados, etanal, ácidos cetónicos e compostos fenólicos. Este composto pode ser adicionado ao mosto ou ao vinho várias vezes ao longo do processo de vinificação e pode ser feito de diferentes formas. Uma das formas de utilização é o metabissulfito de potássio ($K_2S_2O_5$) na forma de cristais, e outra forma de utilização é em soluções sulfurosas (5%) em água ou ainda na forma gasosa (Fugelsang e Edwards, 2007; Malfeito-Ferreira, 2010).

A utilização de SO_2 no vinho é legislada de forma a estabelecer limites à sua aplicação no vinho. Este pode variar entre 150 mg/L e 250 mg/L, dependendo do tipo de vinho e do teor de açúcar (Tabela 1) (Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B; Zuehlke *et al.*, 2013).

A concentração de SO_2 necessária para prevenir o crescimento de microrganismos pode variar com o tipo de vinho, pH, temperatura, densidade e diversidade da população microbiana, fase de crescimento microbiano, teor de etanol, entre outros fatores (Fugelsang e Edwards, 2007). Em leveduras do género *Dekkera/Brettanomyces* a tolerância ao metabissulfito de potássio, medida em meio sintético com 20 g/L de glucose, varia entre estirpes diferentes. A concentração máxima tolerada varia entre 60mg/L e 90 mg/L. Em adega, com SO_2 adicionado sobre a forma de solução aquosa, as várias estirpes de *Dekkera/Brettanomyces* testadas conseguem crescer a concentrações entre 10mg/L e 50 mg/L (Barata *et al.*, 2008a).

1.5.3.2.Dimetildicarbonato (DMDC)

Outro conservante que pode ser utilizado no vinho é o DMDC. A sua aplicação foi permitida nos Estados Unidos, Austrália e na Europa. Foi autorizada a sua utilização até ao valor máximo de 200 mg/L, apenas em vinhos com uma concentração de açúcar acima de 5 g/L. O efeito no vinho contra leveduras e bactérias já foi estudado e sabe-se que a sua eficiência depende de fatores como a estirpe, a concentração inicial de células, a temperatura, o teor de etanol e o valor de pH (Costa *et al.*, 2008; Fugelsang e Edwards, 2007; Portugal *et al.*, 2013).

O DMDC demonstra maior eficácia quando combinado com o sulfuroso ou com o ácido sórbico (Costa *et al.*, 2008). Uma preocupação existente com este produto é a segurança pois é um químico tóxico por ingestão ou inalação, é irritante para os olhos e para a pele e é também inflamável. No entanto, quando é adicionado ao vinho é hidrolisado, deixando de ser tóxico. A sua utilização em adega requiere medidas de segurança de forma a reduzir o risco de acidente (Fugelsang e Edwards, 2007).

O Regulamento (CE) nº606/2009, estabelece que o limite de utilização é de 200 mg/L (Tabela 1). Segundo Renouf *et al.*, (2008), a concentração de 150 mg/L, durante a fermentação alcoólica, é suficiente para inibir o crescimento de *B. bruxellensis*, mas não é suficiente para inibir totalmente a flora microbiana existente no vinho. Contribui também para a redução da contaminação de leveduras em vinho engarrafado, o que permite considerar o DMDC, uma boa solução para a redução de SO₂ nos vinhos engarrafados.

1.5.3.3.Ácido Sórbico

O ácido sórbico é um ácido gordo de cadeia curta, adicionado em sumo de uva e vinho engarrafado, de forma a prevenir a refermentação por *Saccharomyces cerevisiae*, e tem um impacto significativo na viabilidade celular da flora microbiana do vinho (Fugelsang e Edwards, 2007; Renouf *et al.*, 2008).

O Regulamento (CE) nº606/2009, estabelece que o limite máximo de utilização de ácido sórbico, sob a forma de sorbato de potássio, é de 200 mg/L (Tabela 1). O valor recomendado permite o controlo de *S. cerevisiae*, no entanto outras leveduras presentes no ecossistema vínico, possuem outros níveis de resistência (Fugelsang e Edwards, 2007).

Segundo Renouf *et al.*, 2008, o limite de aplicação do ácido sórbico é importante, devido à capacidade de degradação deste composto por bactérias lácticas.

1.5.3.4.Quitosano

A quitina e o quitosano são pequenos polímeros naturais que possuem uma estrutura única com um conjunto de aplicações em diferentes áreas como a biomedicina, a indústria alimentar, a agricultura e ambiente (Devlieghere *et al.*, 2004; Pillai *et al.*, 2009; Aider, 2010; Kong *et al.*, 2010). O quitosano é obtido a partir da quitina que é, juntamente com a celulose, um dos polímeros mais abundantes na natureza. Este polímero pode ser obtido a partir da concha/casca de crustáceos e alguns fungos (Rinaudo *et al.*, 1999; Aider, 2010).

A quitina encontra-se na natureza sob a forma de microfibras cristalinas, que compõe a estrutura do exo-esqueleto de insetos ou crustáceos, como o camarão, o caranguejo ou a lagosta e pode estar presente nas paredes celulares de fungos (Qin *et al.*, 2006; Pillai *et al.*, 2009). O exo-esqueleto dos crustáceos é, geralmente, considerado um resíduo industrial obtido na indústria alimentar. Atualmente estes bio produtos são aproveitados e comercializados para a produção de quitina e quitosano (Pillai *et al.*, 2009).

Estes polímeros são de grande interesse devido à presença de grupos amina, que estão suscetíveis a modificações de forma a alcançar características desejáveis, como a solubilidade. Na quitina, o grau de acetilação é geralmente 0,90, o que indica a presença de um grande número de grupos amina. O quitosano (Figura 4) é obtido pela deacetilação da quitina, através de tratamento com soluções alcalinas e rapidamente é obtido um grau de acetilação até 25-35%. A deacetilação causa alterações nas propriedades químicas e físicas da quitina, conferindo uma melhor solubilidade e reatividade do quitosano (Pillai *et al.*, 2009).

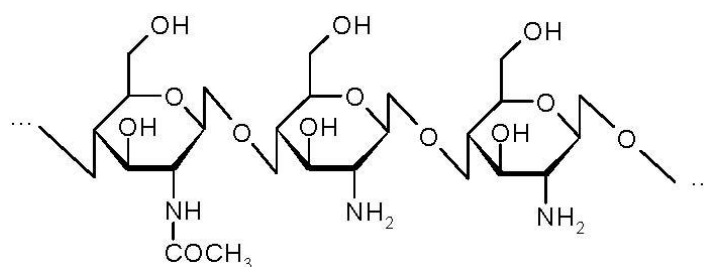


Figura 4 – Fórmula estrutural do quitosano (C₆H₁₁NO₄) (OIV, 2009)

As propriedades físicas e químicas do quitosano, como o peso molecular e o grau de acetilação têm influência nas funcionalidades deste polímero em relação à quitina (Pillai *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). O quitosano tem um peso molecular mais baixo pois possui uma percentagem de grupos acetilo inferior, o que lhe permite ter uma melhor solubilidade que a quitina (Pillai *et al.*, 2009).

A quitina é insolúvel na maior parte dos solventes orgânicos e o quitosano, como se comporta como uma base fraca, pode ser dissolvido em soluções diluídas em ácido, com pH inferior a 6,0. No entanto, o quitosano é insolúvel em água ou solventes orgânicos (Qin *et al.*, 2006; OIV, 2009; Pillai *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). O solvente mais utilizado para dissolver o quitosano é uma solução 1% ácido acético, mas este polímero pode também ser dissolvido em 1% ácido clorídrico e ácido nítrico. Em ácido sulfúrico e ácido fosfórico é insolúvel. A concentração do ácido pode influenciar a capacidade de solubilização do quitosano (Pillai *et al.*, 2009; Kong, *et al.*, 2010).

O quitosano é considerado um produto inodoro, sem sabor, de cor branca, não tóxico, biodegradável, bio funcional, bio compatível e com propriedades antimicrobianas e antifúngicas (OIV, 2009; Aider, 2010; Kong, *et al.*, 2010). É ainda considerado como agente clarificante em sumos de maçã, pêra, entre outros frutos, como antioxidante em molhos,

como inibidor enzimático em sumos de fruta e também pode ser utilizado como filme para cobrir vegetais e fruta fresca no embalamento (Devlieghere *et al.*, 2004).

Segundo a OIV (Organização Internacional da Vinha e do Vinho), o quitosano adicionado no vinho (quitosano enológico) é um polissacárido preparado a partir de uma origem fúngica. É extraído e purificado a partir de fungos como *Agaricus bisporus* e *Aspergillus niger* (OIV, 2009).

O quitosano pode ser adicionado no vinho com o objetivo de reduzir o nível de metais pesados, como o ferro, chumbo, cádmio ou cobre; para reduzir possíveis contaminantes, especialmente Ocratoxina A (toxina de origem fúngica); e para reduzir microrganismos indesejáveis como *Brettanomyces*. Adição do quitosano no vinho pode originar sedimentos, que podem ser removidos posteriormente, através de processo físicos (OIV, 2013).

A capacidade antimicrobiana do quitosano é de grande interesse, pois este é um produto de origem natural. O carácter antimicrobiano provém da existência de cargas positivas nos aminoácidos que ao interagir com as cargas negativas das membranas celulares dos microrganismos podem levar à perda de componentes proteicos e outros componentes intracelulares e também pode inibir o transporte de nutrientes para o interior da célula. Com baixas concentrações de quitosano pode não se verificar qualquer efeito, o que pode estar relacionado com não interação entre as cargas positivas do aminoácidos e as cargas negativas das membranas celulares (Dutta *et al.*, 2009).

O efeito antimicrobiano do quitosano pode depender de vários fatores como o tipo de quitosano (grau de acetilação e deacetilação, peso molecular), pH do meio, temperatura, e componentes da constituição dos alimentos (Devlieghere *et al.*, 2004; Dutta *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010). O quitosano com um peso molecular mais baixo, um grau de acetilação mais baixo, um maior grau de deacetilação, e valores de pH baixos, têm uma melhor atividade antimicrobiana (Dutta *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010).

A dose de quitosano recomendada para aplicação no vinho é de 4 g/hL, ou seja, 0,04 g/L, sendo que o nível máximo recomendado é de 10 g/hL, ou seja, 0,1 g/L (OIV, 2013; Regulamento (CE) nº53/2011).

Em *Brettanomyces*, o efeito antimicrobiano do quitosano pode atuar de duas formas: pode gerar interações entre grupos moleculares do quitosano e a membrana celular, levando à sua desnaturação e eventual morte; e a adsorção do quitosano pelas paredes celulares pode provocar um bloqueio de transferências entre o meio intracelular e extracelular, podendo resultar em morte celular (Rivas-Goméz *et al.*, 2004).

Existem poucos estudos sobre o efeito do quitosano em *Brettanomyces*. O seu efeito foi estudado em *S. cerevisiae*, *B. bruxellensis* e *B. intermedius* por Rivas-Goméz *et al.*, (2004). Neste estudo, os autores mostraram que quanto maior a concentração de quitosano (origem de crustáceos) maior é a fase de latência. No caso de *S. cerevisiae* e *B. bruxellensis*, a concentrações superiores a 2 g/L, 3 g/L e até 6 g/L, a fase de latência é maior e que em *B. intermedius* a concentração de quitosano necessária para aumentar a fase de latência é mais baixa, podendo então dizer que esta espécie é mais sensível ao efeito do quitosano.

No caso do estudo do efeito do quitosano em *S. cerevisiae* juntamente com *B. bruxellensis*, os autores mostraram que *B. bruxellensis* não apresenta crescimento mas que se mantém viável até às 300 horas e que a 2 g/L esta apresenta um crescimento ativo a partir do momento em que o crescimento de *Saccharomyces cerevisiae* diminui. Os autores referem, ainda, que 6 g/L é a concentração necessária para controlar o crescimento de *B. bruxellensis* mas que promove um excelente crescimento de *Saccharomyces cerevisiae*. Este valor é muito superior ao máximo permitido (0,1 g/L) (Rivas-Goméz *et al.*, 2004).

Outro estudo mais recente, de Portugal *et al.*, (2013), estudou o efeito do quitosano enológico (origem fúngica) em várias estirpes de *B. bruxellensis*. Os autores mostraram que a concentração mínima inibitória para *B. bruxellensis* é de 0,062 g/L e que a concentração biocida mínima (MBC₅₀) é de 0,062 g/L. A MBC₅₀, refere-se à eficácia de 0,062 g/L, para reduzir em 50% o número de células nas estirpes de *B. bruxellensis* testadas neste estudo.

Tabela 1 – Limite de aplicação de conservantes no vinho

SO₂	Vinho com < 5 g/L de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose)		
	Vinhos tintos	≤ 150mg/L	Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	Vinhos brancos e rosados	≤ 200mg/L	Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	Vinho com > 5 g/L de teor em açúcares (expresso em glucose + frutose)		
	Vinhos tintos	≤ 200mg/L	Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
	Vinhos brancos e rosados	≤ 250mg/L	Reg. (CE) nº606/2009, Anexo I B
DMDC	≤ 200mg/L		Reg. (CE) nº606/2009
Ácido Sórbito	≤ 200mg/L		Reg. (CE) nº606/2009
Quitano	≤ 0,1g/L		Reg. (CE) nº53/2011

2.MATERIAIS E MÉTODOS

2.1. Estirpes utilizadas

Ao longo de todo o trabalho foram utilizadas diferentes estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* pertencentes à coleção do laboratório de Microbiologia do Instituto Superior de Agronomia (Tabela 2). A manutenção destas estirpes foi feita em meio GYP com adição de carbonato de cálcio (5 g/L). Quando necessárias estas estirpes foram inoculadas em meio GYP (20 g/L de glucose (COPAM, Loures, Portugal); 5 g/L de peptona (Biokar Diagnostics), 5 g/L de Extracto de Levedura (Biokar Diagnostics, Beauvais, France) e 20 g/L de Agar (Iberagar, Coima, Portugal)) e foram incubadas à temperatura de 25°C para obtenção de biomassa.

Tabela 2 - Origem das estirpes de leveduras da espécie *Brettanomyces bruxellensis* utilizadas

Espécie	Nº ISA	Origem
<i>Brettanomyces bruxellensis</i>	1791	Vinho tinto (Dão, Portugal)
	2101	Vinho tinto (Alentejo, Portugal)
	2150	Vinho tinto (Portugal)
	2202	Vinho tinto (ISVEA, Itália)
	2211	Vinho tinto (Douro, Portugal)
	2298	Insectos em adega
	2206	Vinho tinto (ISVEA, Itália)

2.2. Solução de Quitosano

O quitosano (LALLEMAND - França) é insolúvel em água, por isso foi dissolvido numa solução percentagem (V/V) 1% de ácido acético (PANREAC QUIMICA SA).

Para o primeiro ensaio, em meio GYP por incorporação, foram preparadas 5 soluções de quitosano (No Brett Inside - LALLEMAND; extraído do fungo *Aspergillus niger*) com as concentrações: 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L. Preparou-se uma solução 2 g/L e a partir dessa prepararam-se as restantes através de diluições em solução ácido acético 1%.

No segundo ensaio, em meio GYP líquido, foi preparada uma solução *stock* 10 g/L de quitosano dissolvido em solução 1% de ácido acético. Adicionou-se um volume dessa solução *stock* ao meio líquido GYP de forma a obter diferentes concentrações (0,1 g/L, 1 g/L, 2 g/L e 3 g/L) de quitosano em diferentes balões de *erlenmeyer* com um volume total de 100mL. A tabela 3 mostra o volume utilizado da solução *stock*, o volume utilizado de meio

GYP líquido e a concentração de quitosano obtida. Foi ainda preparado um balão de *erlenmeyer* com 70mL de meio GYP líquido e 30mL de solução 1% ácido acético como controlo.

Tabela 3 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em meio GYP líquido

Volume da solução <i>stock</i>	Volume de meio GYP líquido	Volume total	Concentração obtida nos 100mL
30mL	70mL	100mL	3 g/L
20mL	80mL		2 g/L
10mL	90mL		1 g/L
1mL	99mL		0,1 g/L

Para os ensaios em vinho com adição de quitosano no início do ensaio, foi utilizada a mesma solução *stock* para preparar balões de *erlenmeyers* com as concentrações de 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L. Os volumes utilizados para a preparação do ensaio estão indicados na Tabela 4. No ensaio em que só foi testada a concentração 0,1 g/L utilizou-se os volumes da Tabela 4. O controlo para estes ensaios foi preparado com 10mL de solução 1% ácido acético e 90mL de vinho.

Tabela 4 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em vinho em células não adaptadas

Volume da solução <i>stock</i>	Volume de meio GYP líquido	Volume total	Concentração obtida nos 100mL
10mL	90mL	100mL	1 g/L
5mL	95mL		0,5 g/L
1mL	99mL		0,1 g/L
0,5mL	99,5mL		0,05 g/L

Para o ensaio em vinho com adição de quitosano após fase exponencial, utilizou-se a mesma solução *stock*, mas para as concentrações 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L. Os volumes utilizados em cada balão de *erlenmeyer* estão apresentados na Tabela 5. Os volumes estão calculados para 70mL pois já tinha sido retirado 30mL dos 100mL de vinho iniciais para registar o crescimento e a concentração de fenóis até ao final da fase

exponencial. O controlo foi preparado com 7mL de solução 1% ácido acético e 63mL de vinho.

Tabela 5 - Volumes utilizados para preparação do ensaio em vinho em células adaptadas

Volume da solução stock	Volume de vinho	Volume total	Concentração obtida nos 70mL
7mL	63mL	70mL	1 g/L
3,5mL	66,5mL		0,5 g/L
0,7mL	69,3mL		0,1 g/L
0,35mL	69,7mL		0,05 g/L

Para garantir a esterilização das soluções, estas soluções foram sujeitas a uma filtração a vácuo, utilizando filtros de membrana 0,45µm (Millipore).

2.3.Vinho utilizado

O vinho tinto utilizado neste ensaio tinha um teor de etanol inicial de 13,4%, um pH de 3,5 e pertence à adega do Monte D'oiro. O teor de etanol foi medido através de um ebuliómetro (ECOFILTRA) e o pH foi medido utilizando um eléctrodo de pH (Schott instruments blue-line).

Neste ensaio, pretendia-se um vinho com um teor alcoólico de 12% e por isso ajustou-se o grau álcool com uma solução 5 g/L de ácido tartárico.

2.4.Estudo do efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* em meio sintético por incorporação

2.4.1.Preparação do inóculo

A preparação do pré-inóculo iniciou-se com a recolha de biomassa de culturas frescas das estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* ISA 1791, 2101, 2150, 2202, 2211 e 2298, para 50mL de GYP líquido (sem agar) utilizando balões *erlenmeyer* de 100mL. Os balões foram posteriormente colocados num agitador orbital (ARALAB) a 25°C e 120rpm até atingir um valor de densidade ótica (D.O.) aproximadamente igual a 1. A D.O. foi medida através de um espectrofotómetro (Boeco S-20 - Inglaterra).

2.4.2.Meio de cultura e condições de crescimento

Neste ensaio foi utilizado meio GYP com duas concentrações diferentes de agar. Foi colocada uma camada fina de GYP, com 20 g/L de agar em placa e após solidificação, foi colocado meio GYP semissólido, com 14 g/L de agar, previamente inoculado com 100µL de pré-inóculo com uma D. O. aproximadamente igual a 1, para se proceder à incorporação. As placas foram incubadas a 25°C, em estufa (Sanyo MIR-162) durante cerca de 2 a 3 dias.

Todos os meios utilizados nos ensaios foram preparados com água destilada seguida de uma autoclavagem a 121°C durante cerca de 20 minutos.

Depois da incorporação do meio com 100µL de inóculo e da solidificação das placas foram colocadas gotas de 10µL de cada uma das concentrações de quitosano para determinar a concentração mínima inibitória nas diferentes estirpes. Para excluir a hipótese do efeito do ácido acético no crescimento foi colocada uma gota de 10 µL de solução 1% de ácido acético (filtrada) nas placas. Este ensaio foi feito em duplicado.

2.5.Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* em meio GYP líquido

2.5.1.Preparação do inóculo

A preparação do pré-inóculo iniciou-se com a recolha de biomassa de culturas frescas das estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* ISA 1791 e ISA 2202 para 50mL de GYP líquido (sem Agar) utilizando balões *erlenmeyer* de 100mL. Os balões de *erlenmeyer* são posteriormente colocados num agitador orbital (ARALAB) a 25°C e 120rpm, até atingir um valor de D.O. aproximadamente igual a 0,5.

2.5.2.Meio de cultura e condições de crescimento

Para este ensaio foram utilizados 5 balões de *erlenmeyer* de 100mL, para cada uma das estirpes testadas. Cada um dos balões continha meio GYP líquido com concentrações de quitosano diferentes (0,1 g/L, 1 g/L, 2 g/L e 3 g/L) e uma concentração celular inicial de 10^4 células/mL. Para além de 4 *Erlenmeyers* com diferentes concentrações de quitosano foi preparado um quinto que continha apenas solução 1% de ácido acético adicionado ao meio GYP líquido como controlo. Para cada um dos balões de *erlenmeyer* foi utilizada uma rolha de borracha com uma agulha de forma a imitar condições de micro oxigenação (Figura 5).

Os balões de *erlenmeyer* foram guardados, durante o ensaio, a uma temperatura média de 20°C e foi seguido o seu crescimento durante vários dias.



Figura 5 – Balão de *erlenmeyer* com rolha de borracha e seringa.

O desenvolvimento das estirpes de *B. bruxellensis* nos diferentes balões foi seguido através do espalhamento em placa em meio GYP sólido, inoculando 100µL de diferentes diluições, previamente preparadas; e através da contagem ao hemocitómetro das células viáveis, utilizando um microscópio (Leitz-Dialux 20). As diluições necessárias foram feitas utilizando solução de Ringer (Biokar Diagnostics). As placas foram posteriormente incubadas em estufa a 25°C e após o aparecimento de colónias foi feita a sua contagem. Estes ensaios foram todos feitos em duplicado.

A utilização do hemocitómetro iniciou-se com uma centrifugação (Eppendorf Microcentrifuge 5415D, Hamburg, Germany) de 1mL de vinho (10 minutos a 13,2rpm), depois ressuspendeu-se em solução de Ringer e por fim diluiu-se em solução azul-de-metileno (MERCK, Darmstadt, Germany). Após juntar o azul-de-metileno, aguardou-se cerca de 3 a 5 minutos e colocou-se no hemocitómetro para contagem de células ao microscópio. As contagens ao hemocitómetro foram comparadas com as contagens em placa para uma melhor análise do desenvolvimento microbiano e para determinar a existência de células no estado VBNC.

De forma a testar o quitosano em *B. bruxellensis*, numa perspetiva mais realista, prosseguiu-se para ensaio em vinho.

2.6.Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol em vinho em células não adaptadas

2.6.1.Preparação do inóculo

No primeiro ensaio em vinho a preparação do pré-inóculo iniciou-se com a recolha de biomassa de culturas frescas das estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* ISA 1791 e ISA 2202 para 50mL de GYP líquido com 6% de etanol (sem Agar) utilizando balões *erlenmeyer* de 100mL. Os balões são posteriormente colocados num agitador orbital a 25°C e 120rpm, até atingir um valor de D.O. igual a 0,5.

No segundo ensaio em vinho a preparação do inóculo foi semelhante ao ensaio anterior, mas foi preparado para 5 estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* ISA 1791, ISA 2202, ISA 2298, ISA 2206 e ISA 2150.

O pré-inóculo foi preparado com 6% de etanol para adaptar as estirpes à elevada concentração de etanol do vinho (12%).

2.6.2.Condições de crescimento

No primeiro ensaio foram utilizados 5 balões de *erlenmeyer* de 100mL, para cada estirpe, com 100mL de vinho inoculado com uma concentração inicial de 10^5 células/mL. Foram testadas as concentrações 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L, e foi utilizado um balão para o controlo com ácido acético. O quitosano foi adicionado no dia 0 do ensaio.

Em cada um dos *Erlenmeyers* foram utilizadas rolhas de borracha com uma agulha para imitar condições de micro oxigenação e estes balões foram incubados a uma temperatura média de 20°C. O efeito do quitosano foi seguido em placa com meio GYP, por contagem ao hemocitómetro, como no ensaio anterior, e pela produção de 4-etilfenol. O ensaio foi feito em duplicado.

O segundo ensaio foi realizado nas mesmas condições que o ensaio em vinho anterior. No entanto, para este ensaio testou-se apenas a concentração de 0,1 g/L (concentração máxima permitida para aplicação no vinho) para 5 estirpes diferentes, em duplicado. Esta concentração foi introduzida nos balões no início do ensaio, tendo uma concentração celular inicial de 10^3 células/mL no vinho.

2.7.Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol em vinho em células adaptadas

Este ensaio foi realizado em vinho nas mesmas condições que os ensaios anteriores mas o quitosano foi adicionado após a fase exponencial, com uma concentração celular de cerca de 10^6 células/mL.

O crescimento foi seguido em placa e hemocitómetro até atingir a fase estacionária. Quando a cultura atingiu esta fase prepararam-se soluções de 70mL (vinho e solução de quitosano) conforme as concentrações pretendidas de quitosano (Tabela 5) e um controlo apenas com ácido acético. Após adição do quitosano, a viabilidade celular foi seguida em placa e hemocitómetro, como no ensaio anterior. Foi também analisada a produção de 4-etilfenol. O ensaio foi realizado em duplicado.

Os resultados dos ensaios realizados em meio sintético e em vinho foram analisados utilizando o programa matemático MATLAB (MATLAB 7.12.0.635 – R2011, USA).

2.9.Produção de fenóis voláteis

2.9.1.Amostragem

Ao longo dos vários ensaios realizados em vinho, foram retiradas amostras de 13mL para posterior quantificação de fenóis voláteis. As amostras foram colocadas em tubos de 15mL e conservadas a -18°C até ao momento da extração. Após a extração, foi feita a análise cromatográfica utilizando um equipamento de cromatografia gasosa (Varian CP-3800 com Stabilwax 30m, 0,25mm e com uma coluna 0,25 μL).

2.9.2. Extração de 4-vinilfenol e 4-etilfenol

Antes da extração, as amostras foram descongeladas à temperatura ambiente. Depois foram colocadas num copo de precipitação para acertar o pH a 8, através da utilização de um medidor de pH. Para acertar o pH foram utilizadas soluções de NaOH e de HCL. Depois, num balão volumétrico de 10mL, colocou-se 0,5mL de padrão interno (10 g/L de 3,4 Dimetilfenol (Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)) e perfez-se o volume com o vinho a pH 8. Depois retirou-se o volume total do balão volumétrico de 10mL para um balão volumétrico de 25mL, com um agitador magnético previamente colocado, e adicionou-se 4mL de solução de éter/hexano 50% (VWR International, Radnor, Pennsylvania; Merck) e colocou-se a agitar durante 5 minutos.

Após agitação, foi efetuada uma decantação para separar a fase aquosa e a fase orgânica (Figura 6). A fase orgânica foi colocada num frasco no fim das três decantações. Depois da primeira decantação, adicionaram-se 2mL de solução éter/hexano 50% e colocou-se a agitar novamente mais cinco minutos, voltando a decantar-se a amostra. Após a segunda decantação, adicionou-se mais 2mL de solução éter/hexano 50%, colocou-se a agitar mais 5 minutos e decantou-se uma última vez, colocando-se sempre a fase orgânica num frasco à parte.



Figura 6 - Separação de fase aquosa e fase orgânica utilizando uma ampola de decantação.

Após o processo de decantação, utilizou-se uma pipeta de *Pasteur* para colocar o sobrenadante da fase orgânica num tubo vial, para injeção automática no equipamento de CG.

2.9.3. Análise cromatográfica

O programa que foi utilizado para a análise cromatográfica inicia com uma temperatura de 50°C. A temperatura aumenta cerca de 10°C/minuto até uma segunda temperatura de 215°C. Após atingir esta temperatura, a temperatura vai aumentar 20°C/minuto, atingindo então uma temperatura final de 250°C. Esta temperatura final mantém-se durante 10 minutos.

A temperatura de injeção é de 230°C e a temperatura de detecção é de 250°C. Este equipamento utiliza o *software Galaxy chromatography workstation V1.9.3.2.* que permite a análise dos dados recolhidos através do GC.

2.9.4.Quantificação do 4-etilfenol

A quantificação do 4-etilfenol foi feita através da identificação dos picos correspondentes ao 4-etilfenol e ao 3,4-dimetilfenol (padrão interno). Para cada um destes picos (Figura 7) foi recolhido o valor do tempo de retenção e a área. Através destes valores foi determinada a concentração de 4-etilfenol. A análise dos dados foi feita através do *software Galaxy chromatography workstation*.

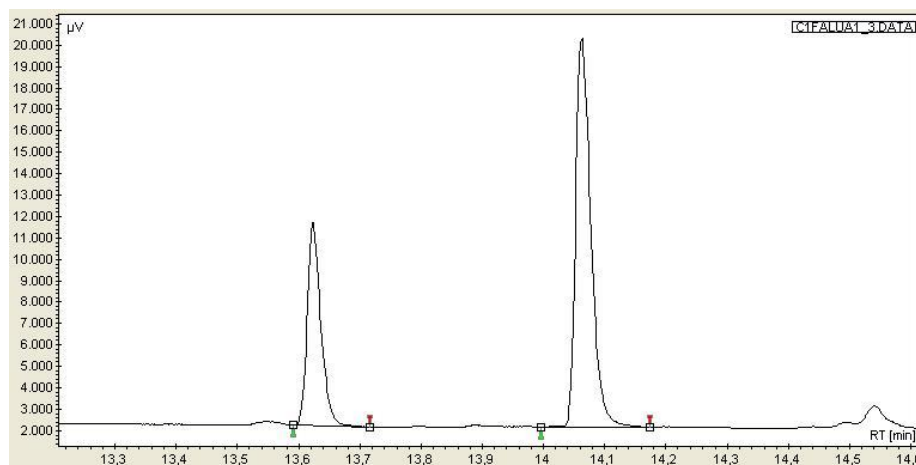


Figura 7 - Picos detetados no intervalo entre 13,65 e 14,15 GC (1º 4-EF (13,66 minutos) e 2º padrão interno (14,14 minutos)).

3.RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Estudo do efeito do quitosano no crescimento de *Brettanomyces bruxellensis* em meio sintético

O efeito do quitosano foi avaliado em meio sólido e líquido. Em meio sólido testaram-se as concentrações 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L, 1 g/L e 2 g/L. Para as estirpes testadas, ISA 1791, 2101, 2202, 2211 e 2298, as concentrações de quitosano não foram eficazes na inibição, ou seja, não se verificou nenhum halo de inibição que demonstrasse a atividade antimicrobiana deste conservante (Figura 8). Considerou-se que provavelmente o quitosano não possui capacidade de se difundir no agar do meio.



Figura 8 – Ensaio em meio sólido com gotas de quitosano de diferentes concentrações.

Tendo em conta estes resultados, testou-se o quitosano em meio líquido em duas estirpes, ISA 1791 e ISA 2202, utilizando as concentrações mais elevadas de quitosano, 0,1 g/L, 1 g/L, 2 g/L e 3 g/L. Com concentrações superiores a 1 g/L, para as duas estirpes, verificou-se uma redução da viabilidade para valores inferiores ao limiar de deteção em menos de 1 dia. Não houve recuperação de viabilidade durante os 37 dias do ensaio, bem como nos 15 dias seguintes, pois foi feita uma análise isolada para verificar se os resultados eram os mesmos (resultados não apresentados).

O efeito de 0,1 g/L de quitosano está apresentado na Figura 9 para as duas estirpes testadas. Depois da adição do quitosano verificou-se uma diminuição na viabilidade celular, em particular para a estirpe ISA 1791, que voltou a recuperar seguindo depois um crescimento típico de leveduras. O crescimento apresentou-se de uma forma típica para

leveduras e foi semelhante ao crescimento do controlo na presença de ácido acético, (resultados não apresentados).

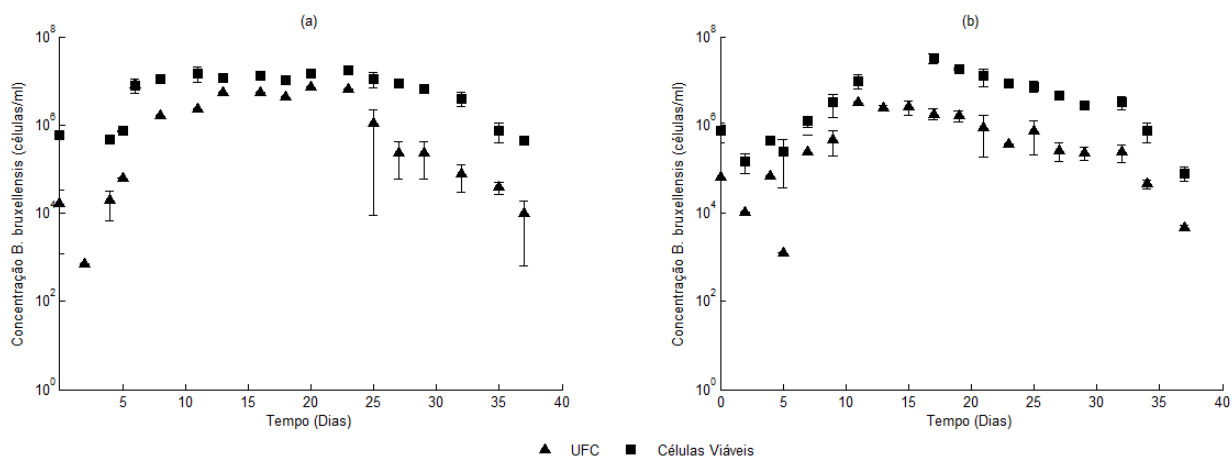


Figura 9 – Comportamento das estirpes de *Brettanomyces bruxellensis* ISA 1791 (a) e ISA 2202 (b) em meio GYP com 0,1 g/L de quitosano. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

A percentagem de células no estado VBNC com 0,1 g/L de quitosano foi 76,8% para a estirpe ISA 1791 e 90,12% para a estirpe ISA 2202. Esta percentagem é calculada em função da diferença entre células viáveis e UFC. No controlo, com ácido acético, a percentagem de células no estado VBNC foi 78,8% para a estirpe ISA 1791 e 91,1% para a estirpe ISA 2202. Para as duas estirpes, as percentagens de células no estado VBNC foram semelhantes com e sem quitosano, demonstrando que o quitosano não induziu o estado VBNC.

Rivas-Goméz *et al.*, (2004) mostraram que com uma concentração de 2 g/L de quitosano *B. bruxellensis* apresenta um crescimento ativo, o que não se verificou neste ensaio, pois com esta concentração ocorreu a inibição do crescimento. Os autores referem ainda, que apenas com 6 g/L ou mais foi possível controlar o crescimento de *B. bruxellensis*, que não coincidiu com os resultados neste ensaio, pois com concentrações a partir de 1 g/L foi possível inibir o seu crescimento.

A diferença nos resultados pode estar relacionada com as diferenças nos métodos dos ensaios. No estudo de Rivas-Goméz *et al.*, (2004) a concentração de glucose do meio foi de 30 g/L, a concentração inicial de células foi de 10^5 células/mL e as condições de incubação foram a 30°C num agitador orbital. Neste ensaio foi utilizado meio com 20 g/L de glucose, uma concentração inicial de células de 10^4 células/mL e as condições de incubação foram a

25°C sem agitação. Para além das diferenças nos métodos utilizados, a utilização de uma estirpe diferente também pode também ter influência. Outro aspeto que pode influenciar a eficácia do quitosano é a sua origem, pois os autores, Rivas-Goméz *et al.*, (2004), utilizaram quitosano com origem em crustáceos e o quitosano utilizado neste ensaio foi quitosano enológico, de origem fúngica. O quitosano de origem fúngica é mais deacetilado, tornando-o mais eficaz como agente antimicrobiano.

Um estudo mais recente (Portugal *et al.*, 2013) mostrou que com uma concentração de 0,062 g/L é possível inibir várias estirpes de *B. bruxellensis* e eliminar 50% das estirpes testadas. Neste ensaio, apenas a partir de 1 g/L foi possível inibir o seu crescimento e com 0,1 g/L, não se verificou redução da viabilidade. Estas diferenças podem estar relacionadas com as diferentes estirpes testadas e com o método em que o ensaio foi realizado, pois os autores utilizaram o método de diluição em placa de microtitulação.

3.2.Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol em vinho em células não adaptadas

Neste ensaio foram testadas concentrações mais baixas que no ensaio anterior (0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L). O vinho foi inoculado com uma concentração celular inicial de 10^5 células/mL e o quitosano foi adicionado no momento em que as células foram inoculadas.

Para as concentrações 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L, nas duas estirpes testadas, o quitosano foi eficaz, não se verificando crescimento durante os 37 dias do ensaio. Quanto à concentração de 4-etilfenol esta apresentou valores pouco significativos, não sendo superior a 234,5 µg/L e a 211 µg/L, para ISA 1791 e ISA 2202, respetivamente. (resultados não apresentados).

Para a estirpe ISA 1791 verificou-se que após a adição de 0,05 g/L de quitosano, a viabilidade celular diminuiu ligeiramente, voltando a aumentar. Esta diminuição pode estar relacionada com a adaptação das células ao vinho, pois é um ambiente mais stressante. A partir do dia 7 até ao final do ensaio (dia 37) deixou de se registar crescimento celular (Figura 10). A concentração de 4-etilfenol manteve-se ao longo do ensaio sempre constante e com valores pouco significativos, inferiores a 234,5 µg/L. A percentagem de células no estado VBNC foi de 73,8%.

Quanto à estirpe ISA 2202 com 0,05 g/L, a viabilidade celular diminuiu ligeiramente durante dois dias após a adição do quitosano, voltando depois a aumentar ligeiramente. A concentração de células viáveis manteve-se mais ou menos constante, com valores

próximos de 10^5 células/mL, até ao dia 24. Depois desse dia não se verificou crescimento até ao final do ensaio (dia 37). A concentração celular em placa registou sempre uma diminuição até ao dia 18. A partir desse dia até ao final do ensaio não se registou crescimento (Figura 11). Relativamente à concentração de 4-etilfenol esta manteve-se constante e não registou valores muito significativos (inferiores a 345,2 $\mu\text{g/L}$). A percentagem de células no estado VBNC foi em média 72,6%. Os valores apresentados como 0, são na realidade inferiores ao limite de deteção em meio e em hemocitómetro.

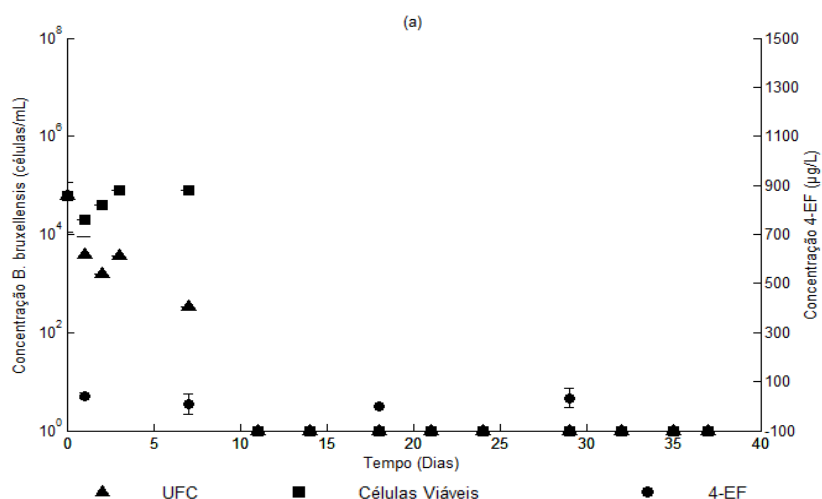


Figura 10 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

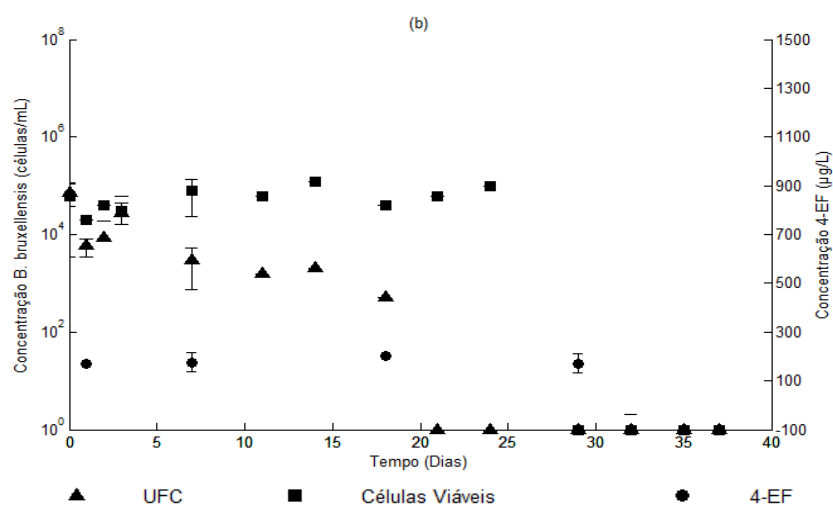


Figura 11 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

Neste ensaio, com concentrações superiores a 0,1 g/L (limite máximo que pode ser aplicado no vinho) foi possível controlar o crescimento de *B. bruxellensis*. Tal não se verificou no ensaio em meio sintético, em que só foi possível controlar o crescimento com concentrações superiores a 1 g/L.

Com a concentração 0,05 g/L, para as duas estirpes, verificou-se que foi possível controlar o crescimento desta levedura, embora não tenha sido de forma tão imediata como com as outras concentrações testadas. No estudo de Rivas-Goméz, *et al.*, (2004) e de Portugal *et al.*, (2013) foram necessárias concentrações mais altas para inibir o crescimento de *B. bruxellensis*, 6 g/L e 0,062 g/L, respetivamente.

A eficácia neste ensaio, em relação ao ensaio anterior em meio sintético, pode estar relacionada com o ambiente mais stressante que é o vinho. Outro fator condicionante que pode estar relacionado com as células não estarem adaptadas ao vinho no momento em que é adicionado o quitosano, tornando-as mais suscetíveis ao seu efeito antimicrobiano.

Depois deste ensaio, foi realizado outro ensaio em que foi inoculado no vinho uma concentração celular mais baixa, de cerca de 10^3 células/mL. Neste ensaio pretendeu-se verificar se a concentração celular é um fator relevante na eficácia do quitosano.

Neste caso testou-se apenas a concentração de 0,1 g/L (limite máximo que pode ser aplicado no vinho) em 5 estirpes diferentes (ISA 1791, ISA 2202, ISA 2298, ISA 2206 e ISA 2150) e o controlo. Esta concentração celular é mais próxima do real comum em vinho contaminado após a fermentação alcoólica.

A concentração testada foi eficaz em todas as estirpes de uma forma imediata (durante os 37 dias do ensaio). A concentração de 4-etilfenol manteve-se constante e não foi significativa para nenhuma das estirpes (inferior a 300 µg/L) (resultados não apresentados).

Assim sendo, com o limite máximo permitido para aplicar no vinho, com concentrações celulares mais baixas e com baixa adaptação celular ao vinho, é possível controlar esta levedura a partir do momento em que o quitosano é adicionado.

Os controlos, ensaio em vinho com solução 1% Ácido acético, mostraram que a solução de ácido acético onde o quitosano foi dissolvido não possui efeito no crescimento de *B. bruxellensis*, dando-se um crescimento com comportamento típico de leveduras durante todo o ensaio e para todas as estirpes (resultados não apresentados).

3.3. Efeito do quitosano na viabilidade de *Brettanomyces bruxellensis* e na produção de 4-etilfenol em vinho em células adaptadas

Neste ensaio o quitosano foi adicionado no fim da fase exponencial do crescimento em vinho. O objetivo foi simular o efeito em populações celulares bem adaptadas ao meio e com concentrações celulares superiores. Neste caso, foram testadas as concentrações de quitosano 0,05 g/L, 0,1 g/L, 0,5 g/L e 1 g/L.

Com as concentrações 0,1 g/L e 0,05 g/L, a estirpe ISA 1791 registou uma ligeira diminuição da concentração celular nos primeiros dias, estando relacionada com a adaptação das leveduras ao vinho. Depois deste ligeiro decréscimo, iniciou-se a fase exponencial e o quitosano foi adicionado no dia 14. Após a adição do quitosano, verificou-se uma diminuição do crescimento durante 2 dias, deixando de se registar crescimento celular durante 3 dias. Depois o crescimento retomou novamente até ao dia 32, quando se iniciou a fase de morte (Figura 12 e 13).

Quanto à concentração de 4-etilfenol, foram registados valores um pouco mais elevados a partir do dia 22, atingindo-se concentrações acima de 430 µg/L. Numa fase mais avançada do crescimento, no dia 30, a concentração de 4-etilfenol atingiu valores entre os 800 µg/L e os 950 µg/L (Figura 12 e 13). Estes valores foram muito superiores ao limiar de preferência deste composto colocando em risco a qualidade do produto. Depois do dia 30 a concentração de 4-etilfenol diminuiu, o que pode estar relacionado com a adsorção do 4-etilfenol. Segundo os autores Larcher *et al.*, 2011 e Morata *et al.*, 2013 é possível a concentração de 4-etilfenol diminuir durante a fermentação.

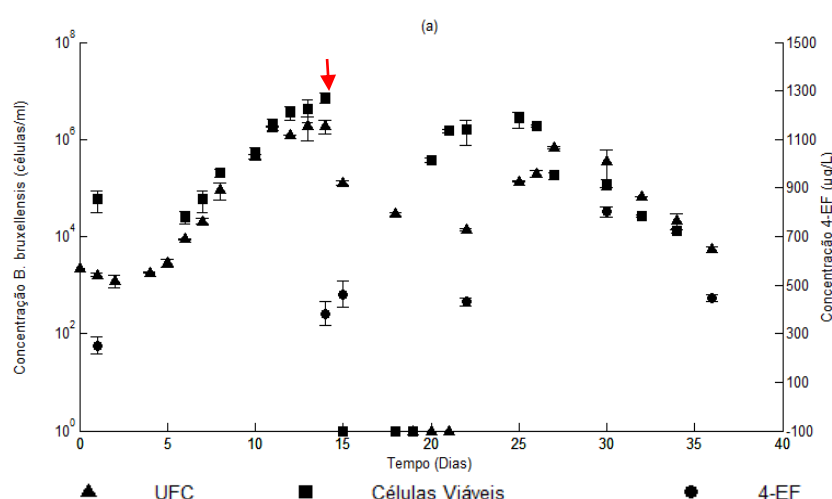


Figura 12 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

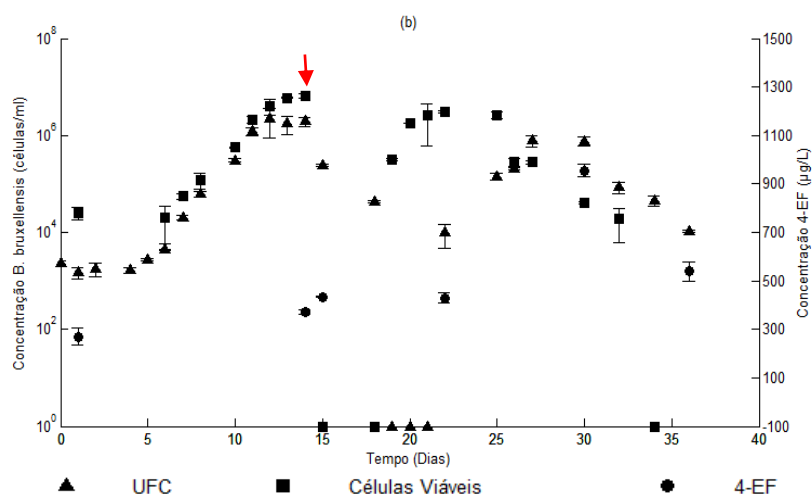


Figura 13 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

Para a estirpe ISA 2202, com as concentrações 0,1 g/L e 0,05 g/L, o comportamento foi semelhante. O crescimento celular entrou logo na fase exponencial e no final da fase exponencial foi adicionado o quitosano (dia 8) e a partir do dia 9 até ao dia 28 não se registou viabilidade celular, retomando o crescimento a partir do dia 29. Com esta concentração, conseguiu-se inibir a atividade de *B. bruxellensis* durante 19 dias mostrando que esta estirpe é menos sensível ao quitosano que a estirpe ISA 1791. A produção de 4-etilfenol não foi significativa registando-se apenas um valor próximo de 500 µg/L, no dia 36 (Figura 14 e 15).

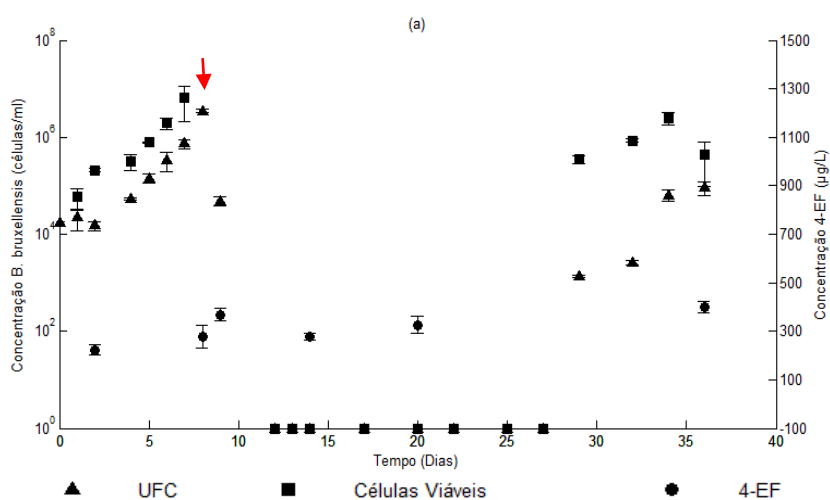


Figura 14 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

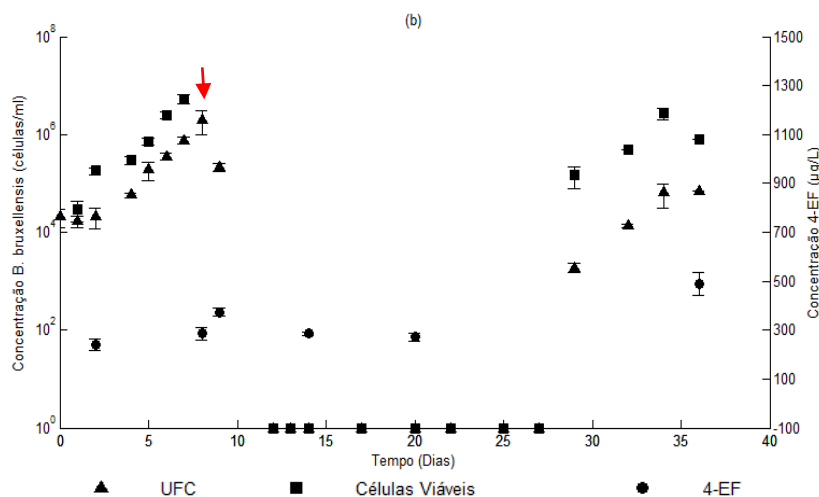


Figura 15 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,05 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

Na estirpe ISA 1791, com as concentrações 1 g/L e 0,5 g/L, o comportamento foi semelhante. O crescimento começou com uma diminuição da concentração celular, retomando o crescimento poucos dias depois. Esta primeira redução da concentração celular pode estar relacionada com a adaptação ao vinho, pois este é um ambiente stressante. Depois da fase exponencial (dia 14) foi adicionado o quitosano e após a adição, a concentração celular começou a diminuir, e a partir do dia 19 até ao final do ensaio (dia 36) não houve registo de células viáveis (Figura 16 e 17). Após 15 dias do final do ensaio, foi feita uma análise isolada que verificou que o resultado até ao dia 36 se mantinha. Quanto à produção de 4-EF, não se verificou uma produção significativa (inferior a 400 µg/L).

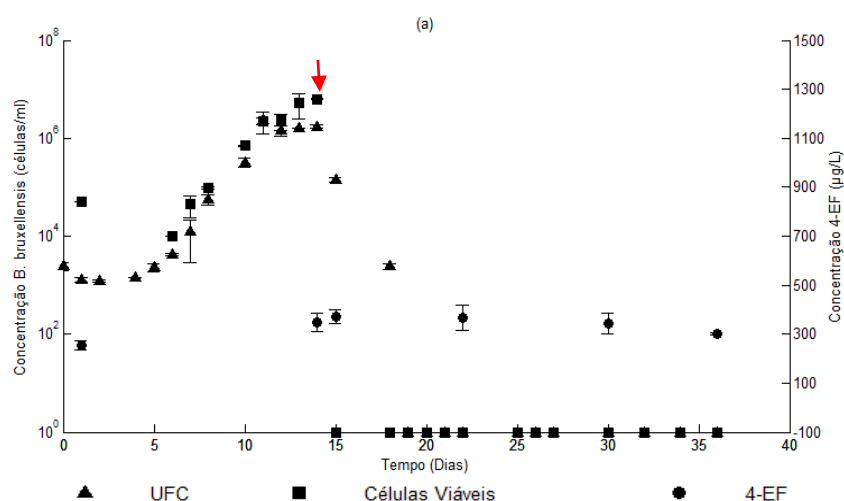


Figura 16 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 1 g/L de quitosano em vinho com células bem adaptadas. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

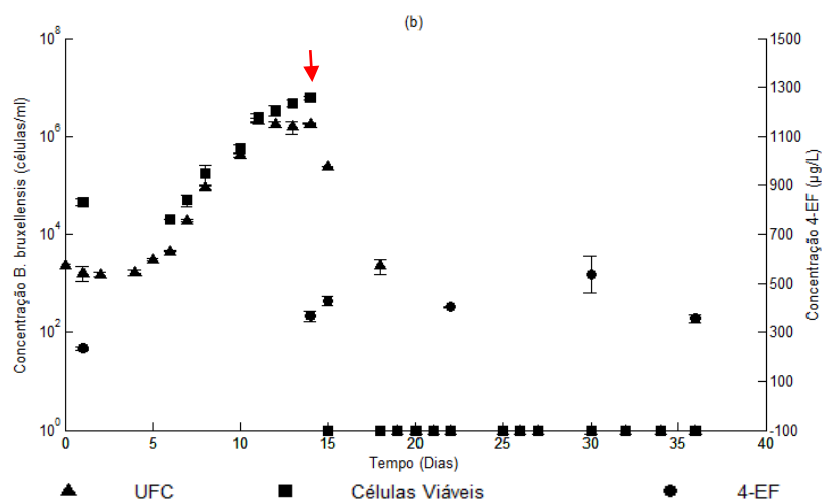


Figura 17 – Comportamento da estirpe ISA 1791 com 0,5 g/L de quitosano em células bem adaptadas do vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

Para a estirpe ISA 2202, com as concentrações 1 g/L e 0,5 g/L o crescimento seguiu um comportamento típico em leveduras até à adição do quitosano (dia 8). Depois verificou-se que o quitosano teve um efeito inibitório, pois a partir do dia 9 até ao final do ensaio não se registou crescimento celular (Figura 18 e 19). A estirpe ISA 2202 mostrou ser mais sensível ao quitosano pois logo após à adição do quitosano deixou de se registar células viáveis, o que não aconteceu de forma tão imediata na estirpe ISA 1791. Quanto à produção de 4-etilfenol não se verificaram valores significativos (inferiores a 400 µg/L).

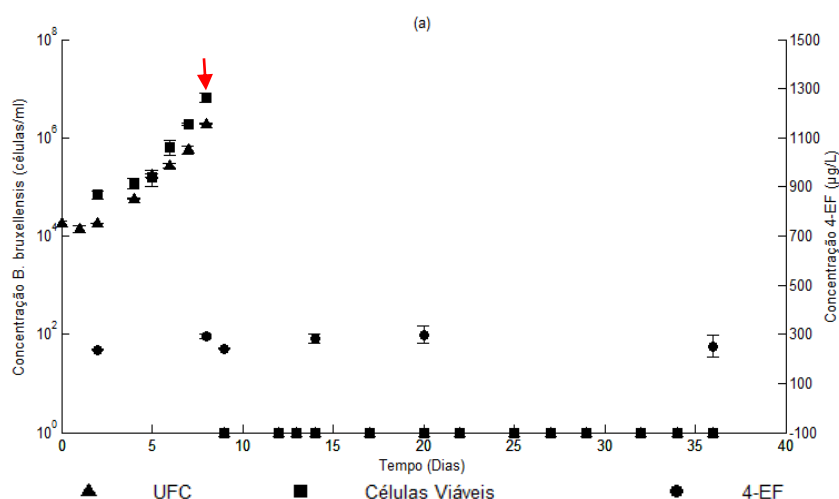


Figura 18 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 1 g/L de quitosano em células bem adaptadas ao vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

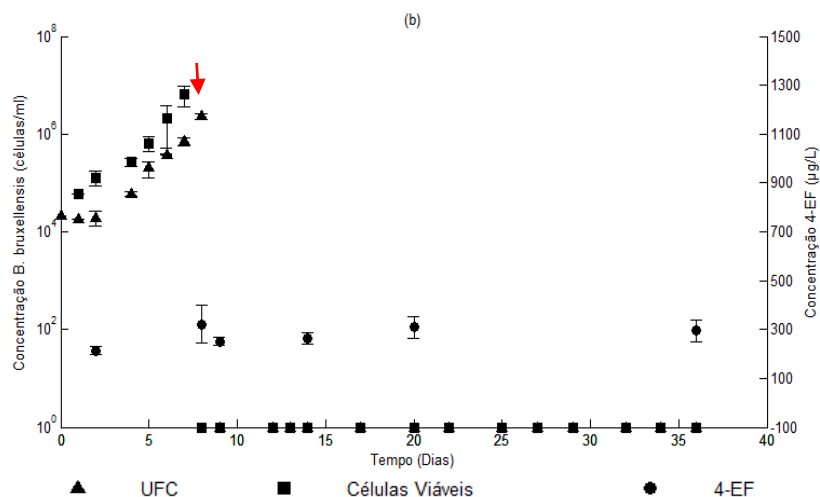


Figura 19 – Comportamento da estirpe ISA 2202 com 0,5 g/L de quitosano em células bem adaptadas do vinho. O desvio padrão é representado pelas barras em cada ponto.

Tal como no ensaio em meio sintético, para as duas estirpes, a concentração de 0,1 g/L não foi capaz de inibir o crescimento de *B. bruxellensis*, embora se tenha registado perda de viabilidade com mais ou menos intensidade após adição do quitosano. Com 0,05 g/L também não foi possível inibir o crescimento desta levedura, mas verificou-se que a estirpe ISA 1791 é menos sensível ao quitosano pois para estirpe ISA 2202 não se verificou crescimento durante um período de tempo maior.

Neste caso o quitosano utilizado foi de origem fúngica tal como o utilizado no ensaio de Portugal *et al.*, 2013. No estudo de Portugal *et al.*, 2013 concentrações a partir de 0,065 g/L seriam suficientes para inibir o crescimento, no entanto, os resultados obtidos demonstram que com as concentrações de 0,1 g/L e 0,05 g/L não foi possível inibir por completo a viabilidade das células de *B. bruxellensis* das 2 estirpes testadas. Esta diferença pode estar relacionada com a diferença de estirpe e com a diferença entre métodos utilizados, pois os autores testaram esta concentração em meio sintético e o crescimento foi seguido a partir da leitura da densidade ótica.

Neste ensaio verificou-se que concentrações superiores a 0,5 g/L em vinho foram suficientes para inibir o crescimento destas duas estirpes. Em meio sintético foi necessário o dobro da concentração para inibir o crescimento (1 g/L). Isto pode ser explicado pelo ambiente mais stressante que é o vinho, pois tem um teor de etanol elevado e um pH mais baixo, bem como uma menor disponibilidade de nutrientes.

No entanto, no primeiro ensaio em vinho, foi possível controlar o crescimento das estirpes de *B. bruxellensis* com 0,05 g/L e 0,1 g/L, o que mostrou que a concentração celular em que foi aplicado o quitosano e o facto de as células estarem bem adaptadas ao ambiente, são fatores que influenciam a capacidade antimicrobiana do quitosano.

O controlo analisado para estes ensaios mostrou um crescimento com comportamento típico de leveduras, não revelando efeito da presença da solução 1% de ácido acético na atividade de *B. bruxellensis* (resultados não apresentados).

A percentagem médias da população de células no estado VBNC neste ensaio, para as duas estirpes e para todas as concentrações foi muito semelhante, tendo variado entre 55% e 65% para a estirpe ISA 1791 e entre 78% e 86% para a estirpe ISA 2202. Estas pequenas variações podem mostrar que a concentração de quitosano não tem uma influência significativa na indução do estado VBNC na população microbiana testada e que é uma característica de estirpe dependente.

4.CONCLUSÕES

Brettanomyces bruxellensis é uma levedura de alteração de vinho que pode ter grandes impactos económicos nesta indústria. Desta forma é importante tentar encontrar formas de controlo deste microrganismo que sejam seguras para o consumidor e que ao mesmo tempo não alterem as características organoléticas do vinho. O quitosano apresenta-se como potencial alternativa aos métodos tradicionalmente utilizados no controlo desta levedura. Tem a vantagem de ser um produto biológico abundante e de fácil produção, e ter demonstrado ser seguro na indústria alimentar e outras indústrias.

Até à realização deste trabalho, não existiam muitos estudos publicados sobre o efeito do quitosano em *B. bruxellensis*, particularmente no vinho. Os resultados deste trabalho permitiram aumentar o conhecimento deste produto de forma a permitir uma possível introdução no processo de controlo de microrganismos de alteração na indústria do vinho.

Foi observado que concentrações de 1 g/L (meio sintético), 0,1 g/L e 0,05 g/L (vinho) são suficientes para controlar o crescimento de *B. bruxellensis*. Os resultados no vinho indicam que as suas condições stressantes (etanol de 12% e um pH de 3,5) favorecem o efeito antimicrobiano do quitosano.

Ao longo dos vários ensaios em vinho concluiu-se que o efeito do quitosano em *B. bruxellensis* está dependente de vários fatores como a estirpe, a concentração celular, a fase de crescimento celular e as características do vinho.

Quando existe uma concentração elevada de células (superior a 10^6 células/mL), após a fase exponencial (quando as células estão muito bem adaptadas ao vinho), apenas foi possível controlar o crescimento desta levedura com concentrações superiores a 0,5 g/L. Quando a concentração celular é mais baixa (cerca de 10^5 células/mL e 10^3 células/mL) e as células não estão bem adaptadas ao vinho foi possível controlar o crescimento de *B. bruxellensis* com as concentrações 0,1 g/L e 0,05 g/L, sendo que com 0,05 g/L o efeito não é tão imediato.

Neste trabalho foi ainda avaliada a influência da utilização do quitosano na produção de 4-EF. Verificou-se que a produção de 4-EF apenas foi significativa no ensaio em vinho com adição de quitosano após a fase exponencial, quando as células se encontravam mais adaptadas ao vinho e tinham capacidade de multiplicação elevada. Nos restantes ensaios a concentração de 4-EF não foi significativa, com uma média de valores inferior a 300µg/L.

Finalmente foi avaliada a influência do quitosano na entrada em estado VBNC, em meio e em vinho. A percentagem de células no estado VBNC nos ensaios com quitosano e nos controlos não foi significativamente diferente, demonstrando-se que o quitosano não induziu

o estado VBNC. Verificaram-se diferenças significativas na percentagem de células no estado VBNC apenas entre estirpes.

Como trabalho futuro e com vista a aprofundar o estudo do efeito do quitosano num ambiente mais próximo da realidade, sugere-se o estudo do efeito do quitosano em *B. bruxellensis* em concentrações celulares mais baixas mas com células bem adaptadas ao vinho. Desta forma poderemos verificar o efeito da concentração celular independentemente do estado celular. Seria interessante estudar o efeito do quitosano não só em *B. bruxellensis* mas também em leveduras de outro género, bem como em bactérias lácticas.

5.REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aider, M. (2010) – Chitosan application for active bio-based film production and potencial in the food industry: review. *LWT-Food Science and Technology*, 43: 837-842 p.

Arriagada-Carrazana, J. P.; Sáez-Navarrete, C.; Bordeu, E. (2005) – Membrane filtration effects on aromatic and phenolic quality of Cabernet Sauvignon wines. *Journal of Food Engineering*, 68: 363-368 p.

Barata, A.; Caldeira, J.; Botelho, R.; Pagliara, D.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2008a) – Survival patterns of *Dekkera bruxellensis* in wines and inhibitory effect of sulphur dioxide. *International Journal of Food Microbiology*, 121: 201-207 p.

Barata, A.; Pagliara, D.; Piccininno, T.; Tarantino, F.; Ciardulli, W.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2008b) – The effect of sugar concentration and temperature on growth and volatile phenol production by *Dekkera bruxellensis* in wine. *FEMS yeast Research*, 8: 1097-102 p.

Barata, A.; Laureano, P.; D'Antuono, I.; Martorell, P.; Stender, H.; Malfeito-Ferreira, M.M Querol, A.; Loureiro, V. (2013) – Enumeration and identification of 4-Ethylphenol production yeasts recovered from the wood of wine ageing barriques after different sanitation treatments. *Journal of Food Research*, 2: 140-149 p.

Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2012) – The microbial ecology of wine grape berries. *Internation Journal of Food Microbiology*. 153: 243-259 p.

Benito, S.; Palomero, F.; Morata, A.; Calderón, F.; Suárez-Lepe, J. A. (2009) – A method for estimating *Dekkera/Brettanomyces* populations in wine. *Journal of Applied Microbiology*, 106: 1743-1751 p.

Burlingame B.; Pineiro, M. (2007) – The essential balance: Risks and Benefits in food safety and quality. *Journal of Food Composition and Analysis*, 20: 139-146 p.

Carrascosa, A.; Muñoz, R.; González, R. (2011) – Molecular wine microbiology. Edição Elsevier. 1ª Edição.

Chatonnet, P.; Boichon, J. P. (1992) – The origin of ethylphenols in wines. *Journal of Science Food Agriculture*, 165-178 p.

Chatonnet, P.; Dubordieu, D.; Boichon, J. (1995) – The influence of *Brettanomyces/Dekkera* spp. And lactic acid bacteria on the ethylphenol content of red wines. *American Journal of Enology and Viticulture*, 46: 463-468 p.

Cocolin, L.; Ercolini, D. (2008) – Molecular Techniques in the Microbial Ecology of fermented foods. Edição Springer. USA.

Cocolin, L.; Kalliopi, R.; Iacumin, L.; Zironi, R.; Comi, G. (2004) – Molecular detection and identification of *Brettanomyces/Dekkera bruxellensis* and *Brettanomyces/Dekkera anomalus* in spoiled wines. *Applied and Environmental microbiology*, 70: 1347-1355 p.

Costa, A.; Barata, A.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2008) – Evaluation of the inhibitory effect of dimethyl dicarbonate (DMDC) against wine microorganisms. *Food Microbiology*, 25: 422-427 p.

Coterno, L.; Aprea, E.; Franceschi, P.; Vida, R.; Vrhovsek, U. (2013) – Overview of *Dekkera bruxellensis* behavior in an ethanol-rich environment using untargeted and targeted metabolomics approaches. *Food Research International*, 51: 670-678 p.

Devlieghere, F., Vermeulen, A.; Debevere, J. (2004) – Chitosan: antimicrobial activity, interactions with food components and applicability as a coating on fruit and vegetables. *Food Microbiology*, 21: 703-714 p.

Dias L (a).; Dias S. F. (2003) – Identification of yeast originated from wine-related environments and capable of producing 4-ethylphenol. *Food Microbiology*, 377-384 p.

Dias L (b).; Pereira-da-Silva, S.; Tavares, M.; Malfeito-Ferreira, M.; Loureiro, V. (2003) – Factors affecting the production of 4-ethylphenol by the yeast *Dekkera bruxellensis* in enological conditions. *Food Microbiology*, 20: 377-384 p.

Du Toit, M. e Pretorius, I. S. (2000) – Microbial spoilage and preservation of wine: Using weapons from nature's own arsenal – A review. *South African Journal of Enology and Viticulture*. 21: 74 – 96 p.

Dutta, P. K.; Tripathi, S.; Mehrotra, G. K.; Dutta, J. (2009) – Perspectives for chitosan based antimicrobial films in food applications. *Food Chemistry*. 114: 1173 – 1182 p.

Enrique, M.; Marcos, J. F.; Yuste, M.; Martinez, M.; Vallés, S.; Manzanares, P. (2007) – Antimicrobial action of synthetic peptides towards wine spoilage yeasts. *International Journal of Food Microbiology*. 118: 318 – 325 p.

FAO/WHO Publication (2003) – Assuring food safety and quality: Guidelines for strengthening national food control systems. *Food and Nutrition*; 76. Disponível em: www.who.int/foodsafety/Publications. Acesso em 20/09/2013.

Fleet, G. H. (2003) – Yeast Interactions and wine flavor. *International Journal of Food Microbiology*, 86: 11-22 p.

Fleet, G. H. (2008) – Wine yeasts for the future. *FEMS Yeasts Research*, 8: 979-995 p.

Fugelsang, K. C.; Edwards, C. G. (2007) – Wine Microbiology – Practical Applications and Procedures. 2ª Edição. Nova Iorque.

García-Ruiz, A.; Bartolomé, S. B.; Martínez-Rodríguez, A. J.; Pueyo, E.; Martín-Álvarez, P. J.; Moreno-Arribas, M. V. (2008) – Potencial of phenolic compounds for controlling lactic acid bacteria growth in wine. *Food Control*, 19: 835-841 p.

Genisheva, Z.; Mussatto, S. I.; Oliveira, J. M.; Teixeira, J.A. (2013) – Malolactic fermentation of wines with immobilised lactic acid bacteria – Influence of concentration, type of support material and storage conditions. *Food Chemistry*, 138: 1510-1514 p.

Grunet, K. G. (2005) – Food Quality and Safety: consumer perception and demand. *European review of Agricultural Economics*; 32: 369-391 p.

Kong, M.; Chen, X. G.; Xing, K.; Park, H. J. (2010) – Antimicrobial properties of chitosan and mode of action: a state of the art review. *International Journal of Food Microbiology*. 144: 51–63 p.

Larcher R.; Puecher, C.; Rohregger, S.; Malacarne, M.; Nicolini, G. (2012) - 4-Ethylphenol and 4-ethylguaiacol depletion in wine using esterified cellulose. *Food Chemistry*. 132: 2126 – 2130 p.

Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. (2003) – Spoilage yeasts in the wine industry. *International Journal of Food Microbiology*. 86: 23-50 p.

Loureiro, V.; Malfeito-Ferreira, M. (2006) – *Dekkera/Brettanomyces* spp.: Food spoilage microorganisms. *Food Spoilage Microorganism*, 354-398 p.

Malfeito-Ferreira, M. (2010) – Yeasts and wine off-flavours: a technological perspective. *Annals of Microbiology*, 61: 95-102 p.

Malfeito-Ferreira, M.; Rodrigues, M.; Loureiro, V. (2001) – The influence of oxygen on the “horse sweat taint” in red wines. *Food Beverage Technol*, 24:34-38 p.

Morata, A.; Vejarano, R.; Ridolfi, G.; Benito, S.; Palomero, F.; Uthurry, C.; Tesfaye, W.; González, C.; Suárez-Lepe, J. A. (2013) - Reduction of 4-ethylphenol production in red wines

using HCDC+ yeasts and cinnamyl esterases. *Enzyme and Microbial Technology*. 52: 99 – 104 p.

OIV (2009) – Codex oenologique international: chitosan. Disponível em www.oiv.int (Acesso em 20 de Novembro)

OIV (2013) – Código Internacional de práticas enológicas Disponível em www.oiv.int (Acesso em 20 de Novembro de 2013)

Pillai, C. K. S.; Paul, W.; Sharma, C. P. (2009) – Chitin an Chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation. *Progress in Polymer Science*, 34: 641-678 p.

Portugal C.; Sáenz, Y.; Rojo-Bezares, B.; Zarazaga, M.; Torres, C.; Cacho, J.; Ruiz-Larrea F. (2013) – *Brettanomyces* susceptibility to antimicrobial agentes used in winemaking: in vitro and practical approaches. *European Food Research and Technology*.

Qin, C.; Li, H.; Xiao, Q.; Liu, Y.; Zhu, J.; Du, Y. (2006) – Water solubility of chitosan na its antimicrobial activity. *Carbohydrate Polymer*, 63: 367-374 p.

Regulamento (CE) nº53. 2011. Regras de execução para categorias de produtos vitivinícolas, para práticas enológicas e restrições que lhes são aplicadas. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 6 p.

Regulamento (CE) nº666. 2009. Regras para categorias de produtos vitivinícolas, práticas enológicas e restrições que lhes são aplicadas. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 59p.

Regulamento (CE) nº852. 2004. Relativo à higiene de géneros alimentícios. Portugal: Jornal Oficial da União Europeia, 54 p.

Renouf, V.; Claisse, O.; Lonvaud-Funel, A. (2007) – Inventory and monitoring of wine microbial consortia. *Applied Microbiology Biotechnology*, 75: 149-164 p.

Renouf, V.; Strehaiano, P.; Lonvaud-Funel, A. (2008) – Effectiveness of dimethyldicarbonate to prevent *Brettanomyces bruxellensis* growth in wine. *Food Control*, 19: 208-216 p.

Ribéreau-Gayon, P.; Dubourdieu, D.; Donéche, B.; Lonvaud, A. (2006) – Handbook of Enology, The Microbiology of wine and vinifications, Volume 1; 2ª Edição.

Rinaudo, M., Pavlov, G.; Desbrières, J. (1999) – Influence of acetic acid concentration on the solubilization of chitosan. *Polymer*, 40: 7029-7032 p.

Rivas-Goméz, L.; Escudero-Abarca, B. I.; Aguilar-Uscanga, M. G.; Hayward-Jones, D. M.; Mendoza, P.; Ramírez, M. (2004) – Selective antimicrobial action of chitonsan against spoilage yeasts in mixed culture fermentations. *Journal of Industrial Microbiology Biotechnology*, 31: 16-22 p.

Serpaggi, V.; Remize, F.; Recorbet, G.; Gaudot-Dumas, E.; Grand, A. S.; Alexandre, H. (2012) – Characterization of the “Viable but nonculturable” (VBNC) state in the wine spoilage yeast *Brettanomyces*. *Food Microbiology*. 30: 438-447 p.

Suárez, R.; Suárez-Lepe, J. A.; Morata, A.; Calderón, F. (2007) – The production of ethylphenol on wine by yeasts of the genera *Brettanomyces* and *Dekkera*: A Review. *Food Chemistry*, 102: 10-21 p.

Umiker, N. L.; Descenzo, R. A.; Lee, J.; Edwards, C. G. (2012) – Removal of *Brettanomyces bruxellensis* from red wine using membrane filtration. *Journal of Food Processing and Preservation*, 37: 799-805 p.

Uscanga, M. G.; Délia, M. L.; Strehaiano, P. (2003) – *Brettanomyces bruxellensis*: effect of oxygen on growth and acetic acid production. *Applied Microbiology Biotechnology*, 61: 157-162 p.

Wedral, P.; Shewfelt, R., Frank, J. (2010) – The Challenge of *Brettanomyces* in wine. *Food Science Technology*. 43: 1474-1479 p.

Zuehlke, J. M.; Petrova, B.; Edwards, C. G. (2013) – Advances in the control of wine spoilage by *Zygosaccharomyces* and *Dekkera/Brettanomyces*. *Annual Review of Food Science and Technology*. 4: 57-78 p.